

**Bakterielles Mikrobiom der Nasenhöhle bei gesunden  
Hunden und Hunden mit nasalen Neoplasien und  
chronischer Rhinitis**

von Barbara Treß

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität  
München

**Bakterielles Mikrobiom der Nasenhöhle bei gesunden  
Hunden und Hunden mit nasalen Neoplasien und  
chronischer Rhinitis**

von Barbara Treß

aus München

München 2018

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Innere Medizin der Kleintiere

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:

Priv.-Doz. Dr. Bianka Schulz

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Bianka Schulz

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Manfred Gareis

Tag der Promotion: 27. Juli 2018

*Meiner Familie*

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>2</b>
<b>1.</b>	<b>Definition und Bedeutung des Begriffs „Mikrobiom“ .....</b>	<b>2</b>
1.1.	Beziehungen zwischen Mikrobiota und ihrem Wirt .....	2
1.1.1.	Physiologische Bedeutung des Mikrobioms .....	2
1.1.2.	Pathogenität durch Mikrobiota.....	3
1.2.	Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung des Mikrobioms .....	4
1.2.1.	Lebensalter .....	5
1.2.2.	Umwelt.....	6
1.2.3.	Antibiotika.....	8
1.2.4.	Prä- und Probiotika.....	10
<b>2.</b>	<b>Analysemethoden zur Untersuchung des Mikrobioms.....</b>	<b>12</b>
2.1.	Kulturbasierte Untersuchungsmethoden .....	12
2.2.	Molekularbiologische Untersuchungsmethoden .....	14
2.2.1.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	14
2.2.2.	Sequenzierungstechnologien.....	15
2.2.2.1.	Amplikon-basierte 16S-rRNA-Sequenzierung .....	16
2.2.2.2.	Metagenom-Shotgun-Sequenzierung .....	17
<b>3.</b>	<b>Mikrobiom in der Nasenhöhle des Menschen.....</b>	<b>18</b>
3.1.	Mikrobielle Gemeinschaften in der Nasenhöhle gesunder Menschen.....	18
3.2.	Mikrobielle Gemeinschaften in der Nasenhöhle erkrankter Menschen ....	20
3.2.1.	Sinonasale Neoplasien.....	20
3.2.2.	Chronische Rhinosinusitis.....	21
3.2.3.	Allergische Rhinitis.....	25
<b>4.</b>	<b>Mikrobiom in der Nasenhöhle von Hunden .....</b>	<b>26</b>
4.1.	Mikrobielle Gemeinschaften in der Nasenhöhle gesunder Hunde.....	26
4.1.1.	Kultur-basierte Untersuchungen .....	26
4.1.2.	Molekularer Nachweis einzelner Bakterienspezies.....	28
4.1.3.	Sequenzierung .....	29
4.2.	Mikrobielle Gemeinschaften in der Nasenhöhle erkrankter Hunde.....	31
4.2.1.	Nasale Neoplasien .....	31
4.2.2.	Chronisch-entzündliche Erkrankungen .....	32

---

<b>III.</b>	<b>PUBLIKATION .....</b>	<b>36</b>
<b>IV.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>57</b>
<b>V.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>67</b>
<b>VI.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>68</b>
<b>VII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>69</b>
<b>VIII.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>99</b>

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

16S-rRNA	16S-ribosomale Ribonukleinsäure
ANOSIM	Analysis of Similarities
BALF	Bronchoalvelarlavage-Flüssigkeit
bTEFAP	Bacterial Tag-encoded FLX Titanium Amplicon Pyrosequencing
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAV-2	canines Adenovirus Typ 2
CD11b <sup>+</sup>	Cluster of differentiation 11b
CRS	chronische Rhinosinusitis
d. h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
et al.	et alii/aliae
etc.	et cetera
HMP	Human Microbiome Project
HPV	humanes Papillomavirus
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
LPR	lymphoplasmazelluläre Rhinitis
MALT	Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
NGS	Next Generation Sequencing
OTU	Operational Taxonomic Unit
PAS-positiv	Periodic Acid Schiff-Reaktion-positiv
PCR	Polymerase-Kettenreaktion

PFGE	Pulsed-Field-Gelelektrophorese
PI-3	Parainfluenzavirus Typ 3
PICRUSt	Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States
Prof.	Professor
QIIME	Quantitative Insights Into Microbial Ecology
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
RDP	Ribosomal Database Project
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
sp.	Spezies
SPF	spezifisch-pathogenfrei
spp.	Spezies pluralis
<i>Staph.</i>	<i>Staphylococcus</i>
T-RFLP	terminaler Restriktionsfragmentlängen-polymorphismus
T <sub>H</sub> 2	T-Helferzellen vom Subtyp 2
UniFrac	Unique Fraction Metric



## I. EINLEITUNG

Sowohl der Körper von Menschen als auch der von Tieren wird von einer Vielzahl an Mikroorganismen wie Bakterien, Archaea, Pilzen und Viren besiedelt (LI et al., 2012). Mit der Etablierung von neuen Untersuchungsmethoden wie der 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung konnte gezeigt werden, wie vielfältig diese mikrobielle Gemeinschaft, das sogenannte Mikrobiom, ist (LANE et al., 1985). Bei der überwiegenden Mehrheit der Mikroorganismen handelt es sich um Kommensalen und Symbionten, doch auch potentiell pathogene Erreger können Bestandteil des Mikrobioms sein (GRICE & SEGRE, 2012). Zahlreiche Untersuchungen zu unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen und Erkrankungen haben das Verständnis für die physiologischen und pathologischen Zusammenhänge innerhalb dieser ökologischen Gemeinschaften maßgeblich erweitert. Dysbiotische Veränderungen als mögliche Faktoren in der Entstehung von Krankheiten sind in den Fokus der Forschung gerückt (HOFFMANN et al., 2016).

Auch die Nasenhöhle gesunder Hunde war bereits Gegenstand von Studien, die eine artenreiche mikrobielle Gemeinschaft in dieser Lokalisation nachweisen konnten (RODRIGUES HOFFMANN et al., 2014; ERICSSON et al., 2016; ISAIAH et al., 2017). Die Rolle von Bakterien bei nasalen Erkrankungen des Hundes ist dagegen weitgehend ungeklärt. Bei Tieren mit chronischer Rhinitis wurde die Beteiligung von Bakterien sowohl als primäre als auch als sekundäre Erreger diskutiert, zumal einige Patienten, wenn auch oft nur kurzfristig, auf eine antibiotische Therapie ansprechen (WINDSOR & JOHNSON, 2006). Auch eine Besiedelung der Nasenschleimhaut mit pathogenen Bakterien bei Hunden mit nasalen Neoplasien wird als sekundär betrachtet, bedingt durch reduzierte lokale Abwehrmechanismen (COHN & REINERO, 2007). Studien, die das Mikrobiom der Nasenhöhle bei Hunden mit nasalen Erkrankungen mithilfe von modernen Sequenzierungsverfahren untersuchen, liegen jedoch bisher nicht vor.

Ziel der durchgeführten Studie war es, aus nasalen Tupferproben mittels 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung das nasale Mikrobiom von gesunden Hunden zu charakterisieren und es mit dem von Hunden mit nasalen Neoplasien oder chronischer Rhinitis zu vergleichen.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Definition und Bedeutung des Begriffs „Mikrobiom“**

Jeder menschliche oder tierische Körper besteht nicht nur aus somatischen Zellen, sondern ist untrennbar mit den auf und in ihm lebenden Mikroorganismen verbunden (TURNBAUGH et al., 2007). Die Anzahl der Zellen bakteriellen Ursprungs übersteigt dabei die Zahl der menschlichen oder tierischen Körperzellen deutlich (PETERSON et al., 2009). Es wird angenommen, dass ein Mensch etwa 10 bis 100 Trillionen Mikroorganismen beherbergt (URSELL et al., 2012). LEDERBERG und MCCRAY (2001) prägten den Begriff „Mikrobiom“ für diese ökologische Gemeinschaft, bestehend aus Kommensalen und Symbionten, aber auch Pathogenen, die eine Einheit mit dem Körper ihres Wirtsorganismus bilden und die Aufrechterhaltung der Gesundheit sowie die Entstehung von Krankheiten beeinflussen können. Das Mikrobiom besteht jedoch nicht ausschließlich aus Bakterien, auch Archaea, Pilze und Viren gehören dieser mikrobiellen Gemeinschaft an (HASEGAWA & CAMARGO, 2015).

Andere Autoren erweitern den Begriff darüber hinaus auf das kollektive Genom dieser Mikrobiota, das genetische Variationen und Genfunktionen bereitstellt, über die die Zellen von Wirbeltieren nicht verfügen (GRICE & SEGRE, 2012). Dafür wird auch der Begriff „Metagenom“ verwendet (JOHNSON & VERSALOVIC, 2012).

Das Mikrobiom variiert sowohl zwischen verschiedenen Individuen (COSTELLO et al., 2009; KASPAR et al., 2015) als auch zwischen unterschiedlichen Lokalisationen im Körper ein und desselben Wirts (HUMAN MICROBIOME PROJECT CONSORTIUM, 2012).

#### **1.1. Beziehungen zwischen Mikrobiota und ihrem Wirt**

In den letzten Jahren hat das Wissen um die Bedeutung der Mikrobiota rasant zugenommen. Sowohl die physiologischen Interaktionen zwischen Mikrobiom und Wirtsorganismus, als auch Pathogenitätsmechanismen, die mit Veränderungen im Mikrobiom einhergehen, stehen im Fokus der Forschung.

##### **1.1.1. Physiologische Bedeutung des Mikrobioms**

Zum großen Teil handelt es sich bei den einen menschlichen oder tierischen Körper besiedelnden Bakterien um Symbionten oder Kommensalen

(DETHLEFSEN et al., 2007). Die Beziehung zwischen Mikroorganismen und Wirt fügt also keiner der beiden Arten Schaden zu, sondern ist für mindestens eine Art mit positiven Effekten verbunden (SACHS et al., 2004; GRICE & SEGRE, 2012). Für viele physiologische Vorgänge wird eine symbiotische Beteiligung der Mikrobiota angenommen. Insbesondere für das Mikrobiom des Darms ist seit Langem bekannt, dass die im Verdauungstrakt lebenden Mikroorganismen einen entscheidenden Anteil an der Verdauung von Nährstoffen und der Aufrechterhaltung von Stoffwechselvorgängen haben (FLINT et al., 2012). Unter anderem konnte nachgewiesen werden, dass sich das Darmmikrobiom von genetisch veränderten adipösen Mäusen hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Energieausbeute aus der aufgenommenen Nahrung im Vergleich zu normalgewichtigen Artgenossen unterscheidet (TURNBAUGH et al., 2006).

Auch für die Funktion des Immunsystems ist die mikrobielle Gemeinschaft unerlässlich (RAKOFF-NAHOUM et al., 2004; MAZMANIAN et al., 2005). Die Konkurrenz um Ressourcen zwischen kommensalen und pathogenen Bakterien stellt eine Barriere für die Besiedelung mit potentiell pathogenen Keimen dar (TILMAN, 2004). Einige symbiotische Bakterien sekretieren Moleküle, die das Wachstum von Pathogenen inhibieren und schaffen durch diese bakterielle Interferenz einen evolutionären Vorteil für sich selbst, aber auch für ihren Wirtsorganismus (BROOK, 2005). In den oberen Atemwegen des Menschen inhibiert etwa *Streptococcus salivarius* durch Produktion von Bacteriocinen die Besiedelung der Nasenhöhle mit Gram-positiven pathogenen Keimen (SANTAGATI et al., 2012). Bei Menschen, die Träger von *Staphylococcus lugdunensis* sind, der das zyklische Peptidantibiotikum Lugdunin produziert, liegt signifikant seltener eine Kolonisation der Nasenschleimhaut mit *Staph. aureus* vor (ZIPPERER et al., 2016). Auch die bakterielle Detoxifikation von Stoffen, die dem Wirt schaden, kann zum Erhalt der Gesundheit des Wirtes beitragen (POOL-ZOBEL et al., 2005).

### 1.1.2. Pathogenität durch Mikrobiota

Die biochemischen Mechanismen, um die Wirtsumgebung zu erkennen, mit Oberflächen des Wirtes zu interagieren und mit dem Wirtsorganismus zu kommunizieren, unterscheiden sich oft nicht zwischen Symbionten, Kommensalen und Pathogenen (SPERANDIO et al., 2003; RENDON et al., 2007). Neben vielen dem Wirt nützlichen Funktionen der Mikrobiota stellen sie auch ein Reservoir für Pathogene und die genetische Information für

Antibiotikaresistenzen dar (HU et al., 2013; LIU et al., 2013b). Veränderungen im Genotyp oder in der Umwelt von nicht-pathogenen Kommensalen können zur Invasion in das Gewebe des Wirtes und damit zur Erkrankung führen (DETHLEFSEN et al., 2007). Daneben liegt bei gesunden Individuen jedoch häufig eine asymptomatische Besiedelung mit bakteriellen Taxa vor, die als pathogen gelten (GARCIA-RODRIGUEZ & FRESNADILLO MARTINEZ, 2002).

Die Theorie, dass Imbalancen im Mikrobiom zur Erkrankung des Wirtsorganismus führen können, wurde auch im Hinblick auf verschiedene Tumorerkrankungen verfolgt. GONG und Mitarbeiter (2014) beschreiben deutliche Unterschiede im Mikrobiom des Rachens bei Patienten mit Larynxkarzinom im Vergleich zu gesunden Personen. So waren die Bakteriengattungen *Fusobacterium* und *Prevotella* vermehrt bei erkrankten Personen nachweisbar. Die Autoren schlussfolgern daraus eine mögliche Beteiligung an der Entstehung des laryngealen Karzinoms. Für *Fusobacteria* ist bekannt, dass sie in der Lage sind, Entzündungsreaktionen auszulösen und die Tumorgenese durch Modulation der Tumormikroumwelt über die Expansion von CD11b<sup>+</sup>-Zellen voranzutreiben (KOSTIC et al., 2013). Auch für das kolorektale Karzinom (BORGES-CANHA et al., 2015), das urotheliale Karzinom (XU et al., 2014) und zervikale intraepitheliale Neoplasien (MITRA et al., 2015) ist eine mögliche ätiologische Beteiligung dysbiotischer Zustände beschrieben worden. Bei der Betrachtung einer möglichen bakteriellen Beteiligung an der Entstehung von Tumoren ist jedoch zu bedenken, dass Neoplasien sich oft über Jahre entwickeln und in verschiedenen Stadien dieses Prozesses unterschiedliche Mikroorganismen beteiligt sein können. In diesem Fall ist der Nachweis der möglicherweise ursächlich beteiligten Bakterien zum Zeitpunkt der klinischen Diagnose eines Tumors nicht mehr möglich (GARRETT, 2015). Auch die Frage, ob eine Dysbiose bereits vor Entstehung einer Neoplasie vorhanden ist und primär zur Kanzerogenese beiträgt, oder ob das Mikrobiom sich erst sekundär aufgrund des Tumorwachstums verändert, ist bisher in den meisten Fällen ungeklärt (GARRETT, 2015).

## **1.2. Einflussfaktoren auf die Zusammensetzung des Mikrobioms**

Das Mikrobiom eines Lebewesens ist nicht statisch, sondern steten Veränderungen durch endogene und exogene Einflüsse unterworfen (VON WINTZINGERODE et al., 1997). Verschiedene Faktoren spielen eine Rolle bei

der Zusammensetzung der individuellen Bakteriengemeinschaft.

### 1.2.1. Lebensalter

Studien bei verschiedenen Spezies haben gezeigt, dass das Mikrobiom der oberen Atemwege nicht von Geburt an stabil ist, sondern mit steigendem Lebensalter einer dynamischen Entwicklung unterliegt (WHELAN et al., 2014; MIKA et al., 2015). Die Annahme, dass ein Fetus erst bei der Geburt mit Mikroorganismen in Kontakt kommt, gilt mittlerweile als überholt. Die Ausbildung eines individuellen Mikrobioms beginnt bereits *in utero* (JIMENEZ et al., 2005; RAUTAVA et al., 2012). Die primäre bakterielle Besiedelung der Nasenschleimhaut von Neonaten hängt unter anderem vom Geburtsmodus ab. So weisen Kinder, die per  *Sectio caesarea* geboren werden, zunächst eine speziesreichere Bakteriengemeinschaft auf, die proportional vermehrt Firmicutes, insbesondere *Staphylococcaceae*, enthält. Nach vaginaler Entbindung dagegen enthält das nasale Mikrobiom des Neugeborenen einen höheren Anteil an Actinobacteria wie etwa *Corynebacterium* (SHILTS et al., 2016).

Im Verlauf des ersten Lebensjahres kommt es beim Menschen zu einem Anstieg der Bakteriendichte, während die Zahl der mikrobiellen Spezies abnimmt (MIKA et al., 2015). *Staphylococcaceae* und *Corynebacteriaceae* sind typische Bestandteile der mikrobiellen Gemeinschaft in der Nasenhöhle innerhalb der ersten drei Lebensmonate, mit zunehmendem Lebensalter nimmt die relative Häufigkeit dieser Bakterienfamilien ab (MIKA et al., 2015).

Eine weitere Studie beschreibt eine nasale Bakteriengemeinschaft, die im Kindesalter eine hohe Diversität aufweist und in erster Linie aus Vertretern der Bakterienfamilien *Moraxellaceae* und *Streptococcaceae* besteht. Im Erwachsenenalter dagegen nimmt die Diversität ab, das Mikrobiom verschiebt sich hin zu *Propionibacteriaceae*, *Clostridiales*, *Corynebacteriaceae* und *Staphylococcaceae* (CAMARINHA-SILVA et al., 2014).

Die Entwicklung der nasalen Mikroorganismen innerhalb der ersten sieben Lebenswochen wurde auch beim Hausschwein untersucht (SLIFIERZ et al., 2015). Hauptbestandteile des porzinen Nasenmikrobioms sind Proteobacteria (51,5 %), Firmicutes (41,0 %) und Actinobacteria (5,1 %). Während der Entwicklung vom Neonaten bis zum Absetzalter nimmt der Anteil an Actinobacteria signifikant ab, während der Anteil an Proteobacteria signifikant ansteigt (SLIFIERZ et al., 2015).

Auch beim alternden Individuum ist das nasale Mikrobiom Veränderungen unterworfen (WHELAN et al., 2014; THEVARANJAN et al., 2016). Der Vergleich der Mikrobiota in Nares und Oropharynx bei erwachsenen Menschen im Alter von 18 bis 40 Jahren und älteren Menschen über 65 Jahre ergab signifikante Unterschiede (WHELAN et al., 2014). So kommt es beim alten Menschen zu einer Angleichung zwischen den Bakteriengemeinschaften, so dass das Mikrobiom der Nares zunehmend dem des Oropharynx entspricht. Die Autoren sehen darin einen möglichen Erklärungsansatz zur erhöhten Anfälligkeit älterer Menschen für Infektionen der oberen Atemwege. Ähnliche Ergebnisse ließen sich in einer Studie von THEVARANJAN und Mitarbeitern (2016) im Maus-Modell nachvollziehen. Quantitativ bestand kein Unterschied in der mikrobiellen Besiedelung der Nasenhöhle zwischen Jungtieren, adulten und alten Mäusen. Die häufigsten Bakterienklassen waren in allen drei Altersgruppen Firmicutes, Proteobacteria, Bacteroidetes und Actinobacteria. Hinsichtlich der relativen Häufigkeit unterschieden sich die Gruppen jedoch signifikant. Während Proteobacteria bei Jungtieren 41,9 % ausmachten, stellten sie bei alten Mäusen einen Anteil von nur 27,9 %. Bacteroidetes dagegen kamen mit 19,5 % häufiger bei alten als bei jungen (9,7 %) Tieren vor. Mit diesen Veränderungen des Mikrobioms ging beim alten Tier die verminderte Fähigkeit einher, auf eine experimentelle Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* mit der Elimination des Erregers zu reagieren (THEVARANJAN et al., 2016).

### 1.2.2. Umwelt

Eine wichtige Funktion der Nase ist das Filtern der Atemluft. Inhalierbare Partikel werden entweder im anterioren Bereich des Nares abgefangen, wo sie etwa durch Niesen entfernt werden, oder über die mukoziliäre Clearance im Bereich des respiratorischen Epithels ausgeschieden werden. Partikel, die bis in den Nasopharynx vordringen, werden abgeschluckt (LIPPMANN et al., 1980). Da die oberen Atemwege bei jedem Atemzug gegenüber der Umwelt exponiert sind, kommt der angeborenen und erworbenen Immunabwehr in diesem Bereich eine besondere Bedeutung zu (SCADDING et al., 2011). Es ist davon auszugehen, dass die Nasenhöhle neben den Bakterien, die dem respiratorischen Mikrobiom zuzuordnen sind, auch Mikroorganismen beinhaltet, die aus der Umwelt stammen (BIRZELE et al., 2017).

Einige Studien widmen sich dem Einfluss verschiedener Umweltfaktoren auf das nasale Mikrobiom des Menschen. CAMARINHA-SILVA und Mitarbeiter (2014)

stellten vergleichende Untersuchungen zum Nasenmikrobiom von Kindern und Erwachsenen aus Deutschland und Gabun in Zentralafrika an. Beim Vergleich beider Studienpopulationen war der Einfluss des Alters jeweils größer als der der Herkunft. Während bei Erwachsenen beider Kontinente 85% der bakteriellen Phyla identisch waren, zeigten sich zwischen den verschiedenen Altersstufen derselben Population größere Unterschiede. Die Autoren schließen daraus, dass die globalen bakteriellen Gemeinschaften, die das Nasenmikrobiom von Menschen ausmachen, bereits seit Tausenden von Jahren bestehen.

Unterschiede lassen sich allerdings im nasalen Mikrobiom von Personen, die in landwirtschaftlichem Umfeld leben, und Personen aus urbanem Lebensumfeld feststellen. Milchvieh-haltende Landwirte weisen im Vergleich zu Stadtbewohnern eine diversere mikrobielle Gemeinschaft auf, die weniger potentiell pathogene Staphylokokken enthält (SHUKLA et al., 2017). Eine Studie, die unter anderem das Mikrobiom im Bereich der anterioren Nasenhöhle zwischen älteren Bewohnern einer Pflegeeinrichtung und im eigenen Haushalt lebenden Senioren verglich, fand keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (ROGHMANN et al., 2017). Auch das Zusammenleben von Menschen und Haustieren kann das Mikrobiom beeinflussen. WIPLER und Mitarbeiter (2017) untersuchten verschiedene Lokalisationen am Körper von Hunden, Katzen und deren Besitzern, und evaluierten auch Tupferproben der Nase. Bei Tierbesitzern, die im zugehörigen Fragebogen eine enge Beziehung im Zusammenleben mit ihrem Haustier angaben, traten mit höherer Prävalenz gemeinsame Bakterienspezies bei Tier und Mensch auf.

Ein weiterer Aspekt, der Gegenstand mehrerer Studien ist, ist die Veränderung im Mikrobiom der humanen Atemwege durch Zigarettenrauch. Die nasalen Mikrobiota von Rauchern beinhalten weniger kommensale aerobe und anaerobe Bakterien, enthalten aber mehr potentielle Pathogene (JASPERS, 2014). Zudem kann die Exposition gegenüber Zigarettenrauch bei Bakterien der Nasenschleimhaut die Bildung von Biofilmen induzieren (GOLDSTEIN-DARUECH et al., 2011). In einer weiteren Studie wurde dagegen nur bei Proben aus dem Bereich der bukkalen Mukosa eine Verminderung der Alpha-Diversität des bakteriellen Mikrobioms bei Rauchern festgestellt, nicht jedoch bei Proben der nasalen Mukosa (YU et al., 2017).

Genetische Faktoren scheinen in einer Studie mit Zwillingspaaren einen geringeren Einfluss auf die Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms zu haben

als Umwelteinflüsse (LIU et al., 2015). Beim Vergleich des Darmmikrobioms unterschiedlicher Menschen- (ZOETENDAL et al., 2001) und Schimpansenfamilien (UENISHI et al., 2007) wurde jedoch eine größere Ähnlichkeit innerhalb der sozialen Familiengruppen festgestellt als zwischen unterschiedlichen Familien, was eine vertikale Übertragung des Mikrobioms über Generationen hinweg und eine gewisse Bedeutung genetischer Faktoren wahrscheinlich macht. Eine Studie, die Daten des *Human Microbiome Project* (HMP) verwendete, bestätigte ebenfalls einen Einfluss genetischer Variationen auf das Mikrobiom verschiedener Lokalisationen im menschlichen Körper, unterstreicht jedoch die Bedeutung weiterer Forschungsarbeit zu diesem Thema (BLEKHMAN et al., 2015).

### 1.2.3. Antibiotika

Die meisten Antibiotika wirken nicht nur selektiv gegen einzelne mikrobielle Spezies, sondern können gegen eine Vielzahl bakteriell bedingter Erkrankungen eingesetzt werden (NATHAN, 2004). Das hat zur Folge, dass auch die kommensalen Mikrobiota durch den antimikrobiellen Wirkstoff erheblich beeinträchtigt werden (LEMON et al., 2012). Typischerweise kommt es bei Verabreichung von Antibiotika zu einer Verminderung der bakteriellen Diversität im Wirtsorganismus (JERNBERG et al., 2007). Zum Großteil erholt sich die mikrobielle Gemeinschaft davon und kehrt innerhalb von Tagen bis Wochen weitestgehend zum Ursprungszustand zurück, einige Taxa sind jedoch auch Jahre nach der Antibiotikatherapie nachhaltig verändert (LOFMARK et al., 2006; JAKOBSSON et al., 2010). Nicht nur die direkte bakteriostatische oder bakterizide Wirkung von Antibiotika führt zur Hemmung des Bakterienwachstums, auch fehlende Bereitstellung von Nährstoffen oder sekundären Metaboliten, sowie der fehlende Abtransport von toxischen bakteriellen Stoffwechselprodukten durch andere Mitglieder der Bakteriengemeinschaft kann das Wachstum der kommensalen Bakterien beeinträchtigen (WILLING et al., 2011). Die Verschiebung des Gleichgewichts innerhalb eines Mikrobioms unter antibiotischer Therapie kann zur Erkrankung des Wirts durch opportunistische Pathogene führen (WILLING et al., 2011).

Veterinärmedizinische Studien zum Einfluss antibiotischer Wirkstoffe auf das Mikrobiom bei Hunden zeigen, dass etwa das fäkale Mikrobiom gesunder Tiere durch die orale Gabe von Amoxicillin in Richtung Gram-negativer Bakterien verschoben wird und es zu einem erhöhten Vorkommen antibiotikaresistenter



*Enterobacteriaceae* kommt (GRONVOLD et al., 2010). Die Verabreichung des Makrolidantibiotikums Tylosin führt zu langanhaltenden, signifikanten Veränderungen des jejunalen Mikrobioms gesunder Hunde. Auch 14 Tage nach Absetzen der Antibiose sind zahlreiche physiologische Spezies noch nicht wieder nachweisbar (SUCHODOLSKI et al., 2009).

Beim Menschen ist auch die Auswirkung von Antibiotika auf das respiratorische Mikrobiom Gegenstand mehrerer aktueller Forschungsprojekte. Laut einer Untersuchung von MAXFIELD und Mitarbeitern (2017) verdoppelt die Anwendung von Antibiotika, unabhängig von der Indikation, Wirkstoffklasse und Behandlungsdauer, das Risiko, in den folgenden zwei Jahren eine chronische Rhinosinusitis (CRS) zu entwickeln. Bei CRS-Patienten ist die antibiotische Vorbehandlung mit einer signifikant schlechteren Lebensqualität innerhalb dieses Zeitraums von zwei Jahren assoziiert. Bei bestehenden chronisch-entzündlichen Erkrankungen der oberen Atemwege werden Antibiotika eingesetzt, um Infektionen zu eliminieren, die Entzündung zu reduzieren und die Bildung von Biofilmen auf der Mukosa zu verhindern (NACLERIO & BAROODY, 2016). Die Therapie der CRS mittels Antibiotika, teilweise in Kombination mit Sinuschirurgie, wurde von verschiedenen Autoren hinsichtlich der Wirkung auf das nasale Mikrobiom untersucht, die Ergebnisse sind jedoch widersprüchlich. Die postoperative antimikrobielle Chemotherapie bei CRS-Patienten führte in einer Studie nicht zu einer Reduktion der Bakterienlast, bewirkte aber Verschiebungen in der Zusammensetzung der Mikrobiota (HAUSER et al., 2016). In einem anderen Patientenkollektiv dagegen wurde nach antibiotischer Therapie bei CRS-Patienten mit akuten Exazerbationen mittels quantitativer PCR (qPCR) ein signifikant geringerer Gehalt an bakterieller DNA festgestellt als vor der Behandlung, die Diversität nahm jedoch nach Therapie zu (MERKLEY et al., 2015). FEAZEL und Mitarbeiter (2012) beobachteten einen Rückgang der bakteriellen Diversität bei CRS-Patienten nach Sinuschirurgie und unter Antibiose, jedoch begünstigte eine antibiotische Behandlung die Besiedelung der sinonasalen Mukosa mit Staphylokokken. Nach antimikrobieller Behandlung tritt bei CRS-Patienten in der Folge zudem häufig eine Besiedelung der Nasenschleimhaut mit Erregern, die Resistenzen gegen die zuvor verwendeten Wirkstoffe aufweisen, auf (LIU et al., 2013a). Belastbare Studien zur klinischen Wirksamkeit topisch angewandter antimikrobieller Wirkstoffe bei CRS-Patienten fehlen bisher (LIM et al., 2008; BARSHAK & DURAND, 2017).

Auch bei Patienten, die aufgrund einer anderen, nicht respiratorisch bedingten

Krankheit antibiotisch behandelt werden, kommt es zu Veränderungen und zu Resistenzentwicklungen im nasalen Mikrobiom. Bei Anwendung von Fluorchinolonen wurde in einem Patientenkollektiv eine deutliche Selektion resistenter Staphylokokken in der nasalen Bakteriengemeinschaft nachgewiesen (MUNIER et al., 2015).

#### 1.2.4. Prä- und Probiotika

Probiotika sind definiert als lebende Mikroorganismen, die, wenn sie in ausreichender Menge verabreicht werden, einen positiven Effekt auf die Gesundheit des Wirtes haben (SANDERS, 2008). Unter Präbiotika versteht man ausgewählte fermentierte Inhaltsstoffe, die gezielt eingesetzt werden, um Zusammensetzung und Aktivität vorwiegend der gastrointestinalen Mikrobiota zu beeinflussen und damit Wohlbefinden und Gesundheit zu steigern (ROBERFROID, 2007).

Die prophylaktische und therapeutische Anwendung von Bakterienstämmen gewinnt auch in der Veterinärmedizin zunehmend an Bedeutung, wobei der Fokus bisher auf gastrointestinalen Erkrankungen lag (GRZESKOWIAK et al., 2015). Die gezielte Zufuhr von Probiotika kann die Zusammensetzung und Funktion des Mikrobioms im Wirt durch kompetitive Besiedelung einer ökologischen Nische, durch Produktion von Bacteriocinen, die das Wachstum anderer Bakterienstämme hemmen, oder durch Veränderung des pH-Werts beeinflussen (COPE & LYNCH, 2015). Die Konkurrenz um Substrate oder Rezeptorbindungsstellen wurde etwa *in vitro* bei der probiotischen Spezies *Lactobacillus johnsonii* untersucht, die an im Gewebe des Respirationstrakts vorkommende Rezeptoren wie Gangliotetraosylceramid bindet und damit das Potential hat, spezifische Atemwegspathogene wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* und *Staphylococcus aureus* zu verdrängen (KRIVAN et al., 1988; NEESER et al., 2000). Bacteriocine werden beispielweise von *Lactobacillus sakei* abgesondert, dem eine protektive Wirkung gegen die bei CRS-Patienten vermehrt vorkommende Bakterienspezies *Corynebacterium tuberculostrictum* zugeschrieben wird (ABREU et al., 2012).

Die Wirkungsweise eines Probiotikums auf die mikrobielle Besiedelung der Atemwege hängt nicht zuletzt vom Weg der Applikation ab. Während oral supplementierte Probiotika vor allem durch Translokation mikrobieller Metaboliten, Cytokine oder Immunzellen über die systemische Zirkulation eine Wirkung im Respirationstrakt entfalten, beeinflussen lokal über Nasenspray oder

nasale Lavage verabreichte Bakterienstämme die sinonasalen Mikrobiota und die lokale Immunantwort direkt (COPE & LYNCH, 2015).

In einem Sinusitis-Mausmodell wurden in der Nasenschleimhaut von Mäusen, die intranasal mit *Staphylococcus aureus* und *Staphylococcus epidermidis* beimpft wurden, histologisch weniger Periodic Acid Schiff (PAS)-positive Becherzellen gezählt als bei Tieren, die nur mit *Staphylococcus aureus* behandelt wurden. Die Anzahl an Becherzellen gilt als Maß für die Entzündung des respiratorischen Epithels. Die Autoren erklären diese Beobachtung mit der Sekretion von Serinprotease Esp durch *Staphylococcus epidermidis*, die die Bildung von Biofilmen und die nasale Besiedelung durch *Staphylococcus aureus* inhibiert (CLELAND et al., 2014).

Die orale Verabreichung des probiotischen Stammes *Lactobacillus rhamnosus* R0011 bei CRS-Patienten hatte dagegen im Vergleich zu einem Placebo keinen langfristigen positiven Einfluss auf die Ausprägung der Symptome (MUKERJI et al., 2009). Auch die topische Applikation eines von der Honigbiene (*Apis mellifera*) stammenden Probiotikums aus verschiedenen Lactobacilli und Bifidobacteria (LAB-Mikrobiom) zeigte keinen Effekt auf die klinische Ausprägung, mikrobielle Besiedelung oder Schwere der Entzündung bei Patienten mit CRS (MARTENSSON et al., 2017). Mit der oralen Gabe von *Enterococcus faecalis* dagegen konnte sowohl die Frequenz von Exazerbationen bei CRS-Patienten (HABERMANN et al., 2002) als auch die Frequenz von Rezidiven bei Kindern mit akuter Rhinosinusitis gesenkt werden (KITZ et al., 2012).

Bei gesunden Probanden beeinflusste die tägliche orale Einnahme von *Lactobacillus casei* über sechs Wochen die Besiedelung der Nasenschleimhaut mit alpha- und betahämolisierenden Streptokokken und *Staph. aureus* nicht. Auch die Sekretion von Immunglobulin A im Speichel, das als Marker für die protektive Immunität der Schleimhaut gilt, unterschied sich nicht zwischen der Therapie- und der Placebogruppe (FRANZ et al., 2015). Bei Frühgeborenen konnte die Inzidenz von Rhinovirusinfektionen in einer randomisierten, placebo-kontrollierten, doppelblinden Studie jedoch sowohl durch die Gabe von Probiotika (*Lactobacillus rhamnosus* GG) als auch durch ein Präbiotikum, bestehend aus Galactooligosacchariden und Polydextrose, signifikant gesenkt werden (LUOTO et al., 2014). Auch bei allergisch bedingter Rhinitis bei Kindern mit Birkenpollenallergie zeigte die Verabreichung von *Lactobacillus acidophilus* NCFM und *Bifidobacterium lactis* BI-04 eine Verminderung der eosinophilen Infiltration der Nasenschleimhaut und damit einhergehend eine geringgradige

Verbesserung der Symptome während der Pollensaison (OUWEHAND et al., 2009).

Weitere Forschungsarbeiten zur Bedeutung der Veränderungen im Mikrobiom entlang der Achse vom Gastrointestinal- zum Respirationstrakt bei Patienten mit respiratorischen Erkrankungen wie der CRS sowie zu interindividuellen Unterschieden innerhalb einer Patientengruppe sind notwendig, um gezielte probiotische Therapieoptionen zu etablieren. Auch die Transplantation von Mukus eines gesunden Spenders, analog zur Fäkaltransplantation, die bereits erfolgreich bei chronischen gastrointestinalen Erkrankungen eingesetzt wird, ist eine denkbare Mikrobiom-basierte Therapieform und Gegenstand aktueller Forschung (PSALTIS & WORMALD, 2017).

## **2. Analysemethoden zur Untersuchung des Mikrobioms**

Zum Nachweis von Bakterien stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die sich im Hinblick auf ihre Effektivität beim Nachweis einzelner Bakterienspezies oder der Gesamtheit aller Bakterien einer ökologischen Nische unterscheiden.

### **2.1. Kulturbasierte Untersuchungsmethoden**

Zurückgehend auf die Entwicklung der Kulturplatten-Technik durch Robert Koch im Jahr 1881, wurden Bakterien aus einem Habitat vor Etablierung molekularbiologischer Methoden zur Erfassung des Mikrobioms mittels Nährmedien in Kulturen identifiziert (HIERGEIST et al., 2015). Zahlreiche unterschiedliche Verfahren und Nährmedien stehen zum Nachweis von aeroben sowie anaeroben Bakterien zur Verfügung. Auch vorangegangene Studien zur Untersuchung der mikrobiellen Besiedelung der caninen Nasenschleimhaut bedienten sich dieser Methodik. Die in diesen Studien erhobenen Ergebnisse waren jedoch stark von der Art und Anzahl der verwendeten Nährmedien abhängig. Eine Studie erfasste nur Bakterien, die auf einer Blutagarplatte wuchsen (SMITH, 1961). Eine andere Studie verwendete elf verschiedene Agars zur aeroben und anaeroben Anzucht von Bakterien sowie drei Agars zur Anzucht von Pilzen (CLAPPER & MEADE, 1963). Weitere Untersuchungen nutzten zwischen vier (BAILIE et al., 1978) und sieben Agars (ABRAMSON et al., 1980) mit anschließender Subkultivierung der gewachsenen Bakterienkolonien. Die Differenzierung einzelner bakterieller Taxa erfolgt in der kultur-basierten Bakteriologie anhand ihrer physiologischen und biochemischen Eigenschaften, die im Rahmen verschiedener Subkultivierungsverfahren untersucht werden

(HIERGEIST et al., 2015).

Im Bereich der Mikrobiomforschung, die die Evaluierung der bakteriellen Diversität einer ökologischen Nische zum Ziel hat, stoßen kultur-basierte Methoden allerdings an Grenzen. Zahlreiche Bakterien sind unter Laborbedingungen nicht kultivierbar, da das spezifische Milieu, das sie für ihr Wachstum benötigen, unter Laborbedingungen nicht reproduzierbar ist (VON WINTZINGERODE et al., 1997). STALEY und KONOPKA (1985) prägten den Begriff der „Great Plate Count Anomaly“, der beschreibt, dass mikroskopisch in Probenmaterial oft eine deutlich größere Anzahl verschiedener Bakterien sichtbar ist, als Spezies auf Agarplatten anzuzüchten sind. Die Angaben, wie groß der Anteil an kultivierbaren Bakterien im Vergleich zum Gesamtvorkommen an bakteriellen Spezies ist, variieren. WARD und Mitarbeiter (1990) nehmen an, dass vermutlich weniger als 20% aller Bakterien bekannt sind. AMANN und Mitarbeiter (1995) nehmen bei Umweltkeimen aus Wasser- und Bodenproben je nach Material eine Kultivierbarkeit zwischen 0,001-0,3% an. Vor allem im Bereich der Umweltmikrobiologie wurden verschiedene Ansätze verfolgt, vormals nicht kultivierbare Mikroorganismen im Labor zu vermehren. So kann etwa die gemeinsame Kultivierung in Mischkulturen oder mit als wachstumsfördernd bekannten Bakterienstämmen die Ausbeute einer bestimmten Kultur erhöhen (OHNO et al., 1999; DAVIS et al., 2014). Auch die Zugabe von Signalmolekülen wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Homoserin-Lacton oder einem zellfreien Überstand hat sich als förderlich bei der Anzucht bisher nicht kultivierbarer Bakterien erwiesen (BRUNS et al., 2003).

Humanmedizinische Studien, die kulturelle Nachweise und Sequenzierungsmethoden aus Proben der oberen Atemwege bei gesunden Menschen und bei Patienten mit Erkrankungen der oberen Atemwege vergleichen, kommen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass eine deutliche Diskrepanz zwischen mit beiden Methoden gewonnenen Ergebnissen besteht (FEAZEL et al., 2012; KASPAR et al., 2015). In einer Arbeit von FEAZEL und Mitarbeitern (2012) wurden Tupferproben aus dem *Meatus nasi medius* bei 15 CRS-Patienten und fünf Kontrollpersonen genommen und die Ergebnisse von aerober und anaerober bakteriologischer Routinediagnostik und 16S-rRNA-Sequenzierung verglichen. Während in der kulturellen Untersuchung im Schnitt 2,8 Isolate pro Patient nachweisbar waren, zeigte die Sequenzanalyse, insbesondere im Bereich der anaeroben Bakterien, eine deutlich höhere Biodiversität auf. Bei der

überwiegenden Mehrheit der Studienteilnehmer fanden sich die kulturell isolierten Bakterienspezies auch in der Sequenzanalyse, in einzelnen Fällen wurden in der Kultur jedoch Bakterien angezüchtet, die mittels Sequenzanalyse nicht detektiert wurden. Als mögliche Gründe benennen die Autoren fehlerhaft bestimmte Isolate aufgrund morphologisch ähnlicher verwandter Gattungen oder unzureichende Zuordnung der detektierten Sequenzen durch fehlende Informationen in der Datenbank. Eine Arbeit von KASPAR und Mitarbeitern (2015) verfolgte einen umfangreicheren kulturellen Ansatz, der weit über die übliche bakteriologische Routinediagnostik hinausging, und verglich diesen mit Ergebnissen einer 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung. In der Kultur konnten bei 18 CRS-Patienten und 16 Kontrollpersonen insgesamt 141 verschiedene Bakterientaxa nachgewiesen werden. Dabei wurde eine geringe Übereinstimmung zwischen kulturell und molekularbiologisch erhobenen Daten beobachtet. Mittels Sequenzierung konnte zwar eine größere Anzahl bakterieller Taxa detektiert werden als durch kulturelle Anzucht. Die Differenzierung bis auf Speziesebene gelang bei den Kulturisolaten jedoch bei 96,9%, bei den auf Sequenzanalyse basierend bestimmten Taxa allerdings nur bei 26,6%. Daher schlussfolgern die Autoren, dass auch kultur-basierte Techniken unabdingbar für die exakte Beschreibung des Mikrobioms sind (KASPAR et al., 2015).

## **2.2. Molekularbiologische Untersuchungsmethoden**

Um die Lücke im Nachweis von Bakterien, die durch mangelnde Kultivierbarkeit vieler Spezies entsteht, zu schließen, stehen molekularbiologische Methoden zur Verfügung, die kultur-unabhängig auf der Analyse bakterieller DNA und RNA basieren (AMANN et al., 1995).

### **2.2.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Zur *in-vitro*-Amplifikation von bakterieller DNA hat sich die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) etabliert (MULLIS et al., 1986; SAIKI et al., 1988). Diese ist auch Teil der im folgenden Kapitel beschriebenen Hochdurchsatz-Sequenzierungstechnologien. Zum Nachweis von Bakterienspezies mittels PCR wird das Gen der bakteriellen 16S-ribosomalen Ribonukleinsäure (16S-rRNA) genutzt. Mithilfe der PCR ist es möglich, aus einer Probe, die gemischte DNA enthält, selektiv bakterielle 16S-rRNA-Fragmente zu amplifizieren (AMANN et al., 1995). Die doppelsträngige DNA wird zunächst unter Hitzeeinwirkung denaturiert, danach erfolgt die Anlagerung der Primer im konservierten Bereich der 16S-rRNA (SCHUMANN, 2011). Mithilfe einer DNA-Polymerase werden

die DNA-Fragmente anschließend in mehreren Zyklen amplifiziert (SAIKI et al., 1988).

Im Bereich der quantitativen Beschreibung eines Mikrobioms stößt die Sequenzierungstechnologie an Grenzen. Mit ihr ist nur eine Schätzung der relativen Häufigkeit bakterieller Taxa, nicht jedoch eine absolute Angabe der Bakteriendichte möglich. Hierfür ist die quantitative PCR (qPCR) Methode der Wahl (TAKAI & HORIKOSHI, 2000). Mithilfe eines in die Reaktion eingebrachten Fluoreszenzfarbstoffs wird die Menge an amplifizierter DNA gemessen. Daraus kann auf die Menge an initial vorhandener bakterieller DNA geschlossen werden (BRUNSTEIN, 2013). Die qPCR ist allerdings auf bereits bekannte Proben limitiert. Sind die entsprechenden bakteriellen DNA-Sequenzen noch nicht bekannt, lassen sie sich mittels qPCR nicht detektieren und quantifizieren (SU et al., 2012).

Mit der Durchführung einer PCR sind einige typische Fehlerquellen und Artefakte assoziiert (HUGENHOLTZ et al., 1998; INGLIS et al., 2012). So kommt der Auswahl der Primer entscheidende Bedeutung zu (SUZUKI & GIOVANNONI, 1996). Außerdem können sich während des PCR-Zyklus chimärenartige Sequenzen formieren, die die nachfolgende Analyse ebenso erschweren (KOPCZYNSKI et al., 1994), wie mögliche Kontaminanten (TANNER et al., 1998).

### **2.2.2. Sequenzierungstechnologien**

Die Erkenntnis, dass die Erfassung bakterieller Diversität mittels kultur-basierter Methoden nur unzureichend möglich ist, führte seit den 1980er Jahren zur Entwicklung alternativer Methoden, die auf der Analyse von 16S-rRNA-Sequenzen basieren (OLSEN et al., 1986; WARD et al., 1990; AMANN et al., 1995). Aus ersten Verfahren zur Sequenzierung von DNA (SANGER & COULSON, 1975; MAXAM & GILBERT, 1977; SANGER et al., 1977), die mit zu großem materiellen, zeitlichen und finanziellen Aufwand verbunden waren, um flächendeckend eingesetzt zu werden (METZKER, 2005), entwickelten sich die sogenannten Next-Generation-Sequencing-Technologien (VAN DIJK et al., 2014). Dabei handelt es sich um Hochdurchsatz-Sequenzierungsverfahren, bei welchen aus einer Probe parallel mehrere Millionen Sequenzen generiert werden können (TOROK & PEACOCK, 2012). Je nach Fragestellung stehen dafür verschiedene Verfahren zur Verfügung.

### 2.2.2.1. Amplikon-basierte 16S-rRNA-Sequenzierung

Als Methode zur Untersuchung der bakteriellen Zusammensetzung einer Probe hat sich die 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzanalyse etabliert. Mithilfe dieses Verfahrens lassen sich weitaus mehr Bakterien nachweisen als mit konventionellen Methoden, die kulturbasiert oder mit herkömmlichen molekularen Methoden wie ausschließlich der PCR arbeiten (DOWD et al., 2008). Viele Mikroorganismen, die mittlerweile als Bestandteil des humanen oder caninen Mikrobioms bekannt sind und derart an ihre spezifische Mikroumwelt angepasst sind, dass sie unter Laborbedingungen bisher nicht kultivierbar waren (AURORA et al., 2013), können mittels 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzanalyse erfasst werden.

Das Verfahren beruht auf der Analyse der small subunits (16S-Untereinheit) der ribosomalen Ribonukleinsäure (rRNA) der Bakterien (DOWD et al., 2008). Diese für Prokaryoten spezifische Untereinheit der rRNA bildet zusammen mit verschiedenen Proteinen die bakteriellen Ribosomen. Sie hat eine Größe von etwa 1500 Nukleotiden und enthält neben mehreren konservierten auch neun variable Bereiche, die zur Identifizierung der Spezies herangezogen werden können (SCHUMANN, 2011). Die variablen Bereiche sind zwischen 50 und 100 Basenpaare lang (LIAO, 2000). Die im Rahmen der vorliegenden Studie durchgeführte 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung mittels Illumina MiSeq-Plattform nutzt die Amplifikation der variablen V4-Region der bakteriellen RNA zur Speziesidentifikation. Dabei finden Primerpaare Verwendung, die nach Denaturierung Basenpaare mit flankierenden konservierten Bereichen der isolierten RNA bilden. Auf diese Weise kann die 16S-rRNA von verschiedensten Bakterien amplifiziert werden. Die extrahierte DNA durchläuft zunächst 30 PCR-Zyklen bei 94°C über eine Dauer von drei Minuten, danach 28 Zyklen bei 94°C über 30 Sekunden, 53°C über 40 Sekunden und 72°C über eine Minute, bevor abschließend eine Elongation bei 72°C über fünf Minuten durchgeführt wird. Der erfolgreiche Ablauf der Amplifikation wird in 2%-Agarosegel überprüft. Die entstandenen Amplifikate werden sequenziert und die Ergebnisse mit den bereits bekannten 16S-rRNA-Sequenzen einer Datenbank abgeglichen. Dadurch ist eine Einordnung der nachgewiesenen taxonomischen Einheiten in einen phylogenetischen Stammbaum möglich. Operational Taxonomic Units (OTUs) gelten als nachgewiesen, wenn die Sequenzen der Probe zu mindestens 97% mit der entsprechenden Einheit in der Datenbank des Programms Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME) übereinstimmen (CAPORASO et al., 2010).



Andere Datenbanken, die große Mengen an bekannten 16S-rRNA-Sequenzen enthalten und die zur phylogenetischen Zuordnung genutzt werden können, sind etwa Greengenes (DESANTIS et al., 2006) oder RDP (ribosomal database project) (COLE et al., 2014).

Auch die Amplikon-basierte Sequenzierung der 16S-rRNA-Gene birgt allerdings Limitationen und Quellen der Ergebnisverzerrung (STALLMACH & VEHRESCHILD, 2016). Zwischen verschiedenen Bakterienspezies, aber auch innerhalb unterschiedlicher Stämme derselben Spezies (ACINAS et al., 2004), kann es zu Variationen bei der Anzahl der Kopien des 16S-rRNA-Gens kommen (KLAPPENBACH et al., 2001), was zu einem gewissen Bias in der Analyse führen kann (VETROVSKY & BALDRIAN, 2013). Durch Auswahl der Primer für die Amplifikation kann es zu einer Selektion und damit zur Unter- oder Überrepräsentation bestimmter Bakterienspezies kommen (KLINDWORTH et al., 2013). Da es aufgrund der Länge der entstehenden Sequenzen auf Illumina-Plattformen nicht möglich ist, das gesamte 16S-rRNA-Gen abzudecken, beschränkt man sich mit der Auswahl der Primer auf einen Abschnitt. Die variablen Regionen V1-V3 oder V3-V5 unterscheiden sich aber hinsichtlich der Fähigkeit zur Trennung verschiedener Bakterienspezies (CLAESSON et al., 2010; JUMPSTART CONSORTIUM HUMAN MICROBIOME PROJECT DATA GENERATION WORKING GROUP, 2012). Um die Genauigkeit zu erhöhen, ist anzustreben, das 16S-rRNA-Gen möglichst vollständig zu sequenzieren, gegebenenfalls durch die Sequenzierung mehrerer variabler Regionen (YARZA et al., 2014). Bei einigen bakteriellen Taxa ist die Identifizierung bis auf Speziesebene basierend auf der 16S-rRNA-Sequenzanalyse nicht möglich, da das Gen bei diesen Spezies eine sehr hohe Homologie aufweist (JANDA & ABBOTT, 2007).

#### **2.2.2.2. Metagenom-Shotgun-Sequenzierung**

Eine alternative Sequenzierungsmethode, die sich nicht auf ein Zielgen wie das 16S-rRNA-Gen beschränkt, ist die Metagenom-Shotgun-Sequenzierung (THOMAS et al., 2012). Dabei wird sämtliche in einer Probe enthaltene DNA extrahiert, fragmentiert und anschließend sequenziert, ohne dass dafür eine vorherige PCR-Amplifikation notwendig ist. Dadurch wird die komplette genetische Information der Probe sequenziert (TRINGE & HUGENHOLTZ, 2008). Auch auf diesem Weg ist es möglich, Aussagen zur Taxonomie der vorhandenen Bakterien zu treffen. So können aus den Metagenom-Datensätzen

die 16S-rRNA-Sequenzinformationen extrahiert werden, die eine Zuordnung zu bakteriellen Taxa erlauben (LOGARES et al., 2014; PORETSKY et al., 2014; GUO et al., 2015; RANJAN et al., 2016). Alternativ können alle generierten Sequenzen definierten taxonomischen Gruppen zugeordnet werden, woraus dann die mikrobielle Zusammensetzung der Probe abzuleiten ist (SHARPTON, 2014). Zusätzlich ermöglicht die Metagenomsequenzierung auch eine funktionelle Analyse, etwa die Rekonstruktion metabolischer Stoffwechselwege bei bestimmten Erkrankungen (GREENBLUM et al., 2012), sowie den Nachweis von Pathogenitätsfaktoren, Toxin- oder Antibiotikaresistenzgenen (WANG et al., 2015; WILLMANN et al., 2015). Bei entsprechendem DNA-Extraktionsprotokoll können aus der Probe auch Informationen zu Viren, Phagen, Pilzen (NORMAN et al., 2014) und Parasiten (PALLEN, 2014) gewonnen werden.

Die Auswertung der Daten kann bei der Metagenom-Shotgun-Sequenzierung allerdings dadurch erschwert sein, dass, bedingt durch die Sequenzierung der kompletten DNA in der Probe, viele der generierten Sequenzen keine Informationen für die Bestimmung der bakteriellen Zusammensetzung beinhalten. Daher müssen oft mehr Sequenzen als bei der Amplikon-basierten 16S-rRNA-Sequenzierung erstellt werden, um ausreichend taxonomisch verwertbare Informationen zu erhalten (WANG et al., 2015). Außerdem erfordert diese Methodik aufgrund der sehr großen Datenmengen entsprechende Kapazitäten im Bereich der Datenspeicherung sowie der bioinformatischen Auswertung und Interpretation (SHARPTON, 2014).

### **3. Mikrobiom in der Nasenhöhle des Menschen**

Im Gegensatz zur Veterinärmedizin ist das humane nasale Mikrobiom Gegenstand zahlreicher Forschungsarbeiten und mittlerweile sowohl beim gesunden Menschen als auch bei Patienten mit Erkrankungen der Nasenhöhle mittels Sequenzanalyse untersucht und beschrieben.

#### **3.1. Mikrobielle Gemeinschaften in der Nasenhöhle gesunder Menschen**

Die bakterielle Besiedelung der gesunden Nasenschleimhaut wurde unter verschiedenen Aspekten untersucht. Bei der Definition und Beschreibung des nasalen Mikrobioms ist zu bedenken, dass die oberen Atemwege eine Vielzahl verschiedener anatomischer Nischen mit unterschiedlicher epithelialer Oberfläche auf relativ engem Raum bieten. Während im anterioren Vestibulum Plattenepithel mit Vibrissen, Talg- und Schweißdrüsen vorhanden ist, zeichnet sich das

respiratorische Epithel der Nasenhöhle durch hochprismatische Zellen mit Kinozilien und Becherzellen aus, die kontinuierlich Mukus produzieren (WAGENMANN & NACLERIO, 1992). Die Funktion der oberen Atemwege umfasst das Filtern, Erwärmen und Anfeuchten der Atemluft (GEURKINK, 1983).

SHILTS und Mitarbeiter (2016) analysierten das Mikrobiom der Nase bei 33 Neugeborenen im Alter von 5-140 Tagen. Die mikrobielle Gemeinschaft dieser Population bestand hauptsächlich aus Firmicutes (53,5 %), Actinobacteria (30,6 %), Proteobacteria (12,2 %) und Bacteroidetes (3,5 %). Insgesamt wurde in dieser Studie 328 Genera identifiziert, wobei *Corynebacterium* (28,4 %), *Streptococcus* (21, 9 %), *Staphylococcus* (20,4 %), *Dolosigranulum* (5,5 %) und *Moraxella* (4,4 %) die häufigsten Genera darstellten.

Eine ähnliche Zusammensetzung des Mikrobioms ließ sich auch in der Nasenhöhle Erwachsener nachweisen. Bei der Mehrheit der Probanden dominierten Actinobacteria und Firmicutes, in einigen Fällen auch Proteobacteria. Die am häufigsten detektierten Familien der Actinobacteria waren *Propionibacteriaceae* sowie *Corynebacteriaceae* (FRANK et al., 2010; BASSIS et al., 2014). Proteobacteria sind beim Menschen eher im kutanen als im nasalen Mikrobiom anzutreffen (LEMON et al., 2010). In einer weiteren Studie mit 28 Personen ohne Rhinitis-Anzeichen wurden *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* und *Propionibacterium acnes* als Hauptvertreter des Mikrobioms im *Meatus nasi medius* identifiziert, zusammen mit einigen potentiell pathogenen Keimen, die typischerweise im Nasopharynx nachgewiesen werden, wie *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Streptococcus* sp., *Enterobacter* sp., *Fusobacterium* sp. sowie einige anaerobe Spezies des Stammes Bacteroidetes (RAMAKRISHNAN et al., 2013). Die Autoren schließen daraus, dass diese Bakterien entweder nicht notwendigerweise pathogen sind, oder dass einzelne Individuen als Träger fungieren, bei denen es unter bestimmten Bedingungen zur Vermehrung dieser Spezies und infolgedessen zur Erkrankung kommt (RAMAKRISHNAN et al., 2013). Schon ältere, kultur-basierte Untersuchungen zeigten, dass Gram-negative Bakterien im Gegensatz zum Oropharynx in der Nasenhöhle nicht nachweisbar sind (RASMUSSEN et al., 2000).

Beim Vergleich des nasalen mit dem oralen Mikrobiom wird deutlich, dass sich

beide signifikant unterscheiden. So waren etwa OTUs aus der Familie der *Staphylococcaceae* in allen Nasenabstrichen einer gesunden Studienpopulation nachweisbar und machten einen Anteil von bis zu 55% aus. In der Mundhöhle dagegen wurden kaum *Staphylococcaceae* gefunden (BASSIS et al., 2014). LEMON und Mitarbeiter (2010) beschreiben für den Bereich der Nasenlöcher eine inverse Korrelation zwischen der Prävalenz der Familie *Staphylococcaceae* (Firmicutes), zu der bedeutende Pathogene gehören, und den Familien *Corynebacteriaceae* und *Propionibacteriaceae* (beides Actinobacteria), die als harmlose Kommensalen gelten. Auch das Lungenmikrobiom des gesunden Menschen hat nur wenig mit dem nasalen Mikrobiom gemein (BASSIS et al., 2015).

Der Aspekt der Unterschiede zwischen verschiedenen Lokalisationen in den oberen Atemwegen eines Individuums wurde in einer Studie von YAN und Mitarbeitern (2013) näher beleuchtet. Bei zwölf gesunden Probanden wurden Nares, *Meatus nasi medius* und sphenoethmoidaler Recessus viermal innerhalb von drei Wochen beprobt. Dabei konnte gezeigt werden, dass das Mikrobiom hochindividuell, aber im zeitlichen Verlauf stabil ist. Die Mikrobiota im Bereich des mittleren Nasengangs und des sphenoethmoidalen Recessus waren nahezu identisch, während die der Nares sich signifikant davon unterschieden.

### **3.2. Mikrobielle Gemeinschaften in der Nasenhöhle erkrankter Menschen**

Für zahlreiche Erkrankungen des oberen Respirationstrakts beim Menschen belegen Studien Veränderungen im Mikrobiom der betroffenen Individuen. Die respiratorischen Erkrankungen des Hundes, die Gegenstand dieser Arbeit sind, kommen äquivalent auch in der Humanmedizin vor. Da ähnliche Mechanismen, die zu Abweichungen in der bakteriellen Besiedelung in der Nasenhöhle erkrankter Menschen führen, auch beim Hund denkbar sind, soll das humane nasale Mikrobiom an dieser Stelle vergleichend herangezogen werden.

#### **3.2.1. Sinonasale Neoplasien**

Neoplastische Erkrankungen von Nasenhöhle und paranasalen Sinus treten beim Menschen verhältnismäßig selten auf (LUND et al., 2010). Einer älteren Studie zufolge beträgt der Anteil sinonasaler Tumore an allen malignen Neoplasien weniger als 1% (TUFANO et al., 1999). Die Inzidenz wurde für verschiedene

Patientenkollektive untersucht. Sie wird mit 0,5-1 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner im Jahr in der italienischen Bevölkerung angegeben (MAGNANI et al., 1989), bei der männlichen Bevölkerung Japans treten etwa 2,5 Fälle pro 100.000 Einwohnern jährlich auf (MUIR & NECTOUX, 1980). Epidemiologische Untersuchungen zeigten, dass sinonasale Neoplasien etwa doppelt so häufig bei Männern wie bei Frauen vorkommen (ZYLKA et al., 2008), 75% der Patienten erkranken im Alter von über 50 Jahren (OLSEN, 1997). Die häufigste epitheliale nasale Neoplasie ist das Plattenepithelkarzinom, gefolgt vom adenoid-zystischen Karzinom und dem Adenokarzinom (BATSAKIS, 1979). Seltener treten maligne Lymphome auf (VIDAL et al., 1999); auch andere Tumore wie Melanome (GILAIN et al., 2014), Olfaktoriustumore (THEILGAARD et al., 2003), Osteosarkome (HA et al., 1999) und Chondrosarkome (DOWNEY et al., 2001) sind beschrieben. Als Risikofaktoren für die Entstehung nasaler Malignome gelten die Exposition gegenüber Holzstaub (ACHESON et al., 1968), Chemikalien wie Chrom- und Nickelverbindungen (COMBA & BELLI, 1992), Textilfaserstaub (LUCE et al., 1992) sowie Tabakkonsum (ZHU et al., 2002). Untersuchungen zu mikrobiologischen Faktoren beschränken sich in erster Linie auf virale Komponenten. So untersuchten verschiedene Studien das Vorkommen humaner Papillomaviren (HPV) bei Patienten mit Tumoren der Nasenhöhle (SYRJANEN, 2003; GOVINDARAJ & WANG, 2014). Es wird angenommen, dass HPV-infizierte invertierte Papillome der Nasenhöhle eher zur Transformation in Karzinome neigen als benigne Veränderungen, in denen keine Virus-DNA nachgewiesen werden kann (GOVINDARAJ & WANG, 2014). Untersuchungen zum bakteriellen Mikrobiom von Nasenhöhle und paranasalen Sinus bei Patienten mit malignen Tumorerkrankungen in diesem Bereich existieren bisher nicht.

### 3.2.2. Chronische Rhinosinusitis

Eine bedeutend größere Rolle als Neoplasien der Nasenhöhle spielen beim Menschen chronisch-entzündliche Erkrankungen wie die chronische Rhinosinusitis (CRS). Diese ist den Leitlinien der *International Rhinologic Society* zufolge definiert als Entzündung der Nasen- und Nebenhöhlen, bei der zwei oder mehr der folgenden Symptome auftreten: nasale Obstruktion, Nasenausfluss, Einschränkung des Riechvermögens sowie Schmerz und Druckgefühl im Gesichtsbereich. Endoskopische Befunde sind Polypen, mukopurulenter Ausfluss im *Meatus nasi medius* sowie Ödematisierung und obstruierende Schwellung der nasalen Mukosa. In der Computertomographie

können Schleimhautveränderungen in Sinus und ostiomeatalem Komplex dargestellt werden. Von einer chronischen Erkrankung spricht man, wenn die Erkrankung über mindestens 12 Wochen besteht (FOKKENS et al., 2012). Die Prävalenz der CRS beträgt zwischen 4,5% und 12% und stellt damit eine erhebliche individuelle und gesellschaftliche Belastung dar (DECONDE & SOLER, 2016).

Die Pathogenese dieser Erkrankung ist, ähnlich wie die der chronischen Rhinitis des Hundes (WINDSOR & JOHNSON, 2006), nicht vollständig geklärt (STEVENS et al., 2015). Eine mögliche Beteiligung des nasalen Mikrobioms ist Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Auf der einen Seite existiert die Hypothese, dass Imbalancen im nasalen Mikrobiom sowie die Besiedelung der Nasenschleimhaut mit pathogenen Erregern ursächlich an der Entstehung des Krankheitsbildes CRS beteiligt sind. Andererseits wird angenommen, dass es durch die Dysfunktion der immunologischen Barriere, die Entzündung des Epithels und die Gewebeerstörung im Bereich der Nasennebenhöhlen, die aus allergisch oder nicht-allergisch bedingter Entzündung entstehen kann, erst zur Dysbiose und bakteriellen Überwucherung kommt, was in der Folge die Entzündungsreaktion weiter vorantreibt (MAHDAVINIA et al., 2016).

Verschiedene Studien weisen einerseits eine insgesamt höhere Bakterienlast in der Nasenhöhle von Probanden mit CRS nach (ABREU et al., 2012; BOASE et al., 2013), andererseits ist die bakterielle Diversität in der chronisch-entzündlichen Nasenhöhle vermindert (STEPHENSON et al., 2010; FEAZEL et al., 2012; BOASE et al., 2013). Andere Autoren dagegen kommen zu dem Ergebnis, dass Variationen der nasalen Mikrobiota eher individuell bedingt als Erkrankungen oder unterschiedlichen Probennahme-Lokalisationen geschuldet sind (BISWAS et al., 2015). In einem anderen untersuchten Patientenkollektiv war die bakterielle Diversität bei CRS-Patienten sogar höher als bei gesunden Probanden (AURORA et al., 2013). STEPHENSON und Mitarbeiter (2010) widmeten sich dem Nachweis von Mikroorganismen aus nasalen Schleimhautbiopsien von CRS- und Kontrollpatienten, die aufgrund nicht CRS-assoziiierter Indikationen im Bereich der Nasennebenhöhlen operiert wurden. Verglichen mit der konventionellen Kultur wurden mittels Sequenzierung deutlich mehr Mikroorganismen nachgewiesen, wobei anaerobe Spezies sowie *Staphylococcus aureus* bei Menschen mit Nasenerkrankungen vorherrschend waren. *Staphylococcus*, *Corynebacterium* und *Propionibacterium* sind jedoch auch bei gesunden

Individuen präsent (STEPHENSON et al., 2010; FEAZEL et al., 2012). In einer Studie von STRESSMANN und Mitarbeitern (2011), die kultur-unabhängig mittels 16S-rRNA-Sequenzierung und anschließender terminaler Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-Analyse (T-RFLP) das Mikrobiom in Gewebe- und Mukusproben von 43 CRS-Erkrankten untersuchte, wurden 34 verschiedene Bakteriengattungen nachgewiesen. Überwiegend waren die Gattungen *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Haemophilus*, *Propionibacterium*, *Staphylococcus* und *Streptococcus* vertreten; *Pseudomonas aeruginosa* stellte die häufigste Spezies dar. In diese Studie wurde jedoch keine Kontrollgruppe einbezogen. Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung in der Nasenhöhle zwischen CRS-Patienten und gesunden Menschen wiesen unter anderem FEAZEL und Mitarbeiter (2012) nach. So unterschied sich die Prävalenz von Sequenzen, die der Spezies *Staphylococcus aureus* zuzuordnen sind, nicht zwischen gesunden und kranken Individuen, die relative Häufigkeit war bei CRS-Patienten jedoch erhöht. Diese Beobachtung wurde in einer Untersuchung von BOASE und Mitarbeitern (2013), die sich der PCR kombiniert mit Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie sowie der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung bediente, bestätigt. Einzelnen bakteriellen Taxa wie etwa *Lactobacillus sakei* wird eine protektive Wirkung zugeordnet, während für *Corynebacterium tuberculostrictum* eine pathogene Rolle angenommen wird, was in einer Untersuchung im Maus-Modell bestätigt wurde (ABREU et al., 2012). Auf Stammesebene ist die Häufigkeit von Bacteroidetes bei CRS-Patienten vermindert, während Proteobacteria und Firmicutes vermehrt nachgewiesen werden. Auf Genusebene sind *Prevotella* spp. stärker bei gesunden Menschen, *Staphylococcus* spp. dagegen bei erkrankten Personen, insbesondere bei CRS und gleichzeitig auftretenden nasalen Polypen, vertreten (CHOI et al., 2014b). Die kausale Zuordnung einzelner bakterieller Taxa zur Pathogenese chronisch-entzündlicher nasaler Erkrankungen ist anhand der bisherigen Datenlage jedoch nicht möglich (ANDERSON et al., 2016).

Eine sinonasale Dysbiose bei Patienten mit idiopathischer CRS wird in einer aktuellen Studie von HOGGARD und Mitarbeitern (2017) beschrieben. Sowohl bei Menschen mit gesunden als auch mit chronisch-entzündlich veränderten Nasennebenhöhlen dominieren die Gattungen *Corynebacterium* und *Staphylococcus* das nasale Mikrobiom, zusammen mit zahlreichen weiteren Gattungen wie *Streptococcus*, *Haemophilus* und *Moraxella*. Als dysbiotisch werden in dieser Arbeit variable Bakteriengemeinschaften beschrieben, die von

*Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Pseudomonas*, *Moraxella* oder *Fusobacterium* bestimmt sind. Sie zeichnen sich durch Veränderungen in der Struktur der bakteriellen Besiedelung, verminderte Diversität und erhöhte bakterielle Gesamtlast aus. Besonders häufig treten dysbiotische Zustände bei Individuen mit Komorbiditäten wie Asthma bronchiale oder zystischer Fibrose auf.

AURORA und Mitarbeiter (2013) verglichen das Mikrobiom in Lavageflüssigkeit aus dem *Meatus nasi medius* bei CRS-Patienten und Kontrollpersonen ohne Anzeichen für entzündliche Veränderungen der nasalen Schleimhaut. Qualitativ stellte sich eine sehr ähnliche Bakteriengemeinschaft dar, in beiden Gruppen war ein bisher nicht kultivierter Vertreter der Cyanobakterien vorherrschend. Die bakterielle Diversität war jedoch bei Menschen mit chronisch entzündlich veränderter Nasenschleimhaut signifikant größer; die Anzahl der nachgewiesenen Bakterien war in allen Phyla bei CRS-Patienten höher als in der Kontrollgruppe. Des Weiteren wurden im Rahmen dieser Studie detaillierte Untersuchungen zur Immunantwort der Patienten auf das Mikrobiom durchgeführt. Mittels Durchflusszytometrie wurden der Gehalt an Immunzellen in Spülproben aus dem *Meatus nasi medius* von CRS-Patienten und gesunden Kontrollpersonen bestimmt. Cytokine und Chemokine wurden mit Hilfe des Multiplex-ELISA-Verfahrens gemessen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass bei CRS-Patienten T<sub>H</sub>2-Cytokine signifikant erhöht und Interleukin (IL)-8 signifikant erniedrigt ist. Zur Bestimmung der Immunantwort der Leukozyten aus dem peripheren Blut von CRS-Erkrankten wurden diese mit der Lavageflüssigkeit von gesunden Individuen kultiviert und die IL-5-Sekretion, die das Maß für die T<sub>H</sub>2-Antwort darstellt, mittels ELISpot-Assay bestimmt. Die daraus resultierenden Daten stützen die Theorie, dass CRS in einigen Fällen durch eine überschießende Immunantwort auf kommensale Mikroorganismen ausgelöst wird.

Ein Aspekt, den JOSS und Mitarbeiter (2015) zu bedenken geben, ist die insuffiziente Abbildung des nasalen Mikrobioms bei Beprobung einer einzelnen Lokalisation. Zwar erfassen Tupferproben die Mikrobiota hinreichend, die Unterschiede, die sich beim Vergleich verschiedener paranasaler Sinus innerhalb eines Individuums zeigen, machen jedoch deutlich, dass eine große Heterogenität in der Besiedelung unterschiedlicher anatomischer Lokalisationen besteht.

Verschiedene Autoren widmen sich außerdem der Fragestellung, inwieweit therapeutische Maßnahmen das sinonasale Mikrobiom beeinflussen. Die



Auswertung von Sequenzanalysedaten von 56 CRS-Patienten und 26 Kontrollpersonen von RAMAKRISHNAN und Mitarbeiter (2015) ergab, dass hinsichtlich der Biodiversitätsindices keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen waren. Als Faktoren, die mit einer Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung einhergehen, wurden das Vorhandensein von purulenter Sekretion zum Zeitpunkt der Probensammlung sowie eine gleichzeitig vorliegende Asthma-Erkrankung identifiziert. Des Weiteren wurde in diese Studie das Outcome nach chirurgischer Intervention einbezogen. So war das Behandlungsergebnis der endoskopischen Sinuschirurgie bei den Patienten signifikant besser, deren Mikrobiom zum Zeitpunkt der Operation eine hohe Diversität, sowie eine hohe relative Häufigkeit an Actinobacteria aufwies. Eine andere Arbeit zur Auswirkung chirurgischer Therapie der CRS kam zu dem Ergebnis, dass die Diversität des sinonasalen Mikrobioms postoperativ geringer war als zuvor (CLELAND et al., 2016). Sechs Wochen *post operationem* weist das Mikrobiom im ethmoidalen Sinus die größte Ähnlichkeit mit dem Mikrobiom der anterioren Nares auf (HAUSER et al., 2016).

Neben chirurgischen Therapiemöglichkeiten wird die CRS häufig antibiotisch behandelt (LIU et al., 2013a; MERKLEY et al., 2015). Die Auswirkungen systemischer und topisch angewandter antimikrobieller Wirkstoffe sowie neue Erkenntnisse zum Einsatz von Probiotika wurden in vorangegangenen Kapiteln erläutert.

### **3.2.3. Allergische Rhinitis**

Auch für die allergische Rhinitis gibt es Untersuchungen zum nasalen Mikrobiom (CHOI et al., 2014a; YU et al., 2015). Der Einfluss, den Mikroben auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Funktion des Immunsystems haben, ist bereits seit langer Zeit bekannt (STRACHAN, 1989; MAHDAVINIA et al., 2016). Aufgrund der Annahme, dass die Auseinandersetzung des Immunsystems mit einer großen Zahl an Mikroorganismen einen protektiven Effekt gegen die Ausbildung von Allergien hat, entstand die sogenannte Hygiene-Hypothese (BACH, 2002). CHOI und Mitarbeiter (2014a) verglichen das bakterielle Mikrobiom bei Menschen mit saisonaler allergischer Rhinitis, die auf Gräserpollen reagierten, mittels T-RFLP mit dem von gesunden Probanden. In Proben aus dem *Meatus nasi medius* wurde bei Patienten mit allergischer Rhinitis während der Pollenflugsaison eine signifikant höhere bakterielle Diversität und eine größere Bandbreite an Mikroorganismen festgestellt. Außerdem konnte eine

positive Korrelation zwischen bakterieller Diversität und Zahl der eosinophilen Granulozyten in nasaler Lavageflüssigkeit belegt werden. In Proben aus dem *Vestibulum nasi* dagegen wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden. Die Auswirkungen des Aufwachsens in keimarmer Umgebung im Hinblick auf die Allergieentwicklung wurden auch im Nagermodell untersucht (YU et al., 2015). Mittels Ovalbumin-Sensibilisierung wurde eine allergische Reaktion und zelluläre Infiltration in den Atemwegen von spezifisch pathogen-freien (SPF) Ratten und Kontrolltieren ausgelöst. Die bakterielle Diversität in den Atemwegen der SPF-Tiere war signifikant vermindert, bei den Kontrolltieren waren die Bakterienstämme Proteobacteria und Bacteroidetes signifikant stärker vertreten. Klinisch zeigten die SPF-Ratten stärkere allergie-assoziierte Symptome, eine höhere Immunglobulin E (IgE)-Produktion und eine höhere Gesamtleukozytenzahl. Die Autoren folgern daraus, dass das Aufwachsen in einem exzessiv hygienischen Umfeld eine verminderte bakterielle Diversität in den Atemwegen bedingt, was zu erhöhter Allergieanfälligkeit führt.

#### **4. Mikrobiom in der Nasenhöhle von Hunden**

Die bakterielle Besiedelung der Nasenhöhle von Hunden ist Gegenstand mehrerer Studien, die sich verschiedener Methoden zum Nachweis von Mikroorganismen bedienen. Im folgenden Kapitel soll ein Überblick über den Stand der Forschung sowohl bei gesunden Tieren als auch bei Hunden mit nasalen Erkrankungen gegeben werden.

##### **4.1. Mikrobielle Gemeinschaften in der Nasenhöhle gesunder Hunde**

Um pathologische Abweichungen zu erkennen, ist es zunächst von großer Bedeutung, den physiologischen Zustand zu kennen. Etliche Autoren widmeten sich daher dem Nachweis der Mikrobiota der Nasenschleimhaut bei gesunden Hunden.

##### **4.1.1. Kultur-basierte Untersuchungen**

Einige ältere Studien untersuchten die aerobe und anaerobe Bakteriengemeinschaft in der Nase des Hundes mittels Anzüchtung auf verschiedenen Nährmedien. Die Anzahl der differenzierten Spezies lag bei diesen Untersuchungen zwischen 20 und 53 in der gesamten Studienpopulation, wobei eine hohe individuelle Variabilität beobachtet wurde (SMITH, 1961; CLAPPER & MEADE, 1963; ABRAMSON et al., 1976; BALISH et al., 1977; BAILIE et al.,

1978; ABRAMSON et al., 1980). Beim einzelnen Tier wurden in einer Studie von SMITH (1961), in der 100 gesunde Hunde eingeschlossen wurden, zwei bis drei isolierte Bakterienspezies beschrieben. BAILIE und Mitarbeiter (1978) untersuchten 50 Hunde, bei welchen mittels verschiedener Agarmedien insgesamt 30 bakterielle Genera nachgewiesen werden konnten. Sie benannten *Pasteurella multocida*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Streptococcen der Gruppe D, *Corynebacterium* sp., Enterobacteria, *Neisseria* sp., *Moraxella* sp., *Bacillus* sp., IIj und EF-4, zwei nicht klassifizierte Gruppen aerober, Gram-negativer Bakterien (SAPHIR & CARTER, 1976), als die am häufigsten kultivierten Mikroorganismen aus dem Nasensekret gesunder Hunde. Weitere Isolate, die in geringerer Häufigkeit nachgewiesen wurden, wurden in dieser Studie einer transienten Bakteriengemeinschaft zugeschrieben, d.h. diese Spezies sind kurzfristig in der Nasenhöhle nachweisbar, sind jedoch kein Bestandteil der hauptsächlich nachgewiesenen Bakteriengemeinschaft (BAILIE et al., 1978). CLAPPER und MEADE (1963) nutzen zwölf verschiedene Kulturmedien, um die bakterielle Gemeinschaft aus Nasentupfern von 25 Beagles anzuzüchten. Auch in dieser Studie dominierten Staphylokokken, die bei 100 % der Hunde gefunden wurden, sowie Streptokokken und *Neisseria*, die bei jeweils 92% der Tiere isoliert wurden. Bei einem geringeren Anteil der Tiere wurden *Bacillus* (56 %), *Corynebacterium* (40 %), *Enterococcus* (28 %) und *Pseudomonas* (24 %) detektiert (CLAPPER & MEADE, 1963).

Andere Autoren (ABRAMSON et al., 1976; ABRAMSON et al., 1980) differenzierten in ihren Untersuchungen zwischen Beprobung des anterioren und posterioren Anteils der Nasenhöhle und wiesen so quantitativ und qualitativ unterschiedliche Bakterienpopulationen in den verschiedenen Bereichen dieser anatomischen Nische nach. In einer ersten Studie von ABRAMSON und Mitarbeitern (1976) wurden Proben aus diesen zwei Lokalisationen der Nasenhöhle von 37 Hunden auf aerobes und anaerobes Bakterienwachstum untersucht. Als Hauptbestandteile der caninen nasalen Bakteriengemeinschaft wurden von diesen Autoren Enterokokken und Staphylokokken beschrieben. Die bakterielle Besiedelung des kranialen Abschnitts der Nasenhöhle bestand dabei neben diesen beiden genannten Gram-positiven Gattungen zu 46% aus Gram-negativen Bakterien. Insgesamt wurden hier 33 verschiedene Spezies detektiert. Die im kaudalen Anteil der Nasenhöhle nachgewiesenen Bakterien unterschieden sich davon signifikant, in dieser Region waren acht verschiedene Spezies, darunter vor allem nichtfermentative, Gram-negative Bakterien wie *Pseudomonas*

oder *Acinetobacter* zu finden, die im kranialen Abschnitt der Nasenhöhle nicht auftraten. In einer darauf folgenden Arbeit von ABRAMSON und Mitarbeitern (1980) konnten 25 verschiedene bakterielle Spezies aus anteriorer und posteriorer Nasenhöhle von 92 Hunden isoliert werden. Während im vorderen Bereich der Nasenlöcher bei allen Hunden jeweils mindestens zwei bakterielle Spezies nachgewiesen wurden, die überwiegend den Genera *Streptococcus*, *Clostridia* und *Staphylococcus* zuzuordnen waren, konnten im kaudalen Bereich der Nasenhöhle bei über der Hälfte der Tiere keine Bakterien gefunden werden. Dieser wurde daher bei den betreffenden Hunden als steril angesehen.

BALISH und Mitarbeiter (1977) gingen außerdem der Frage nach, inwieweit Umweltbedingungen die nasale bakterielle Besiedelung von Hunden beeinflussen. Sie verglichen die Isolate aus Nasentupfern von Beagles, die im Labor unter sterilen Bedingungen gehalten wurden, mit denen von Kontrolltieren, die in einer offenen Haltungsumwelt lebten. Insgesamt wurden in dieser gesamten Population 37 aerobe und teilweise anaerobe Bakterienspezies nachgewiesen. Die steril gehaltenen Hunde zeigten dabei eine größere Diversität der nasalen Bakteriengemeinschaft, in dieser Gruppe wurden 18 Mikroorganismen nachgewiesen, die bei den offen gehaltenen Hunden nicht auftraten, unter anderem auch vier verschiedene Hefepilzspezies (BALISH et al., 1977).

#### **4.1.2. Molekularer Nachweis einzelner Bakterienspezies**

Neuere Untersuchungen, die molekulare Nachweismethoden wie etwa die PCR anwenden, fokussieren sich meist auf einzelne potentiell pathogene Bakterienspezies wie etwa Staphylokokken (PAUL et al., 2012; WALTHER et al., 2012; WEDLEY et al., 2014) oder Mykoplasmen (SCHULZ et al., 2015) im Respirationstrakt von Hunden. In einer Studie von PAUL und Mitarbeitern (2012) wurde mittels PCR bei 27% von 119 gesunden Hunden *Staph. intermedius* in Nasentupfern nachgewiesen. Die Typisierung der Staphylokokkenspezies erfolgte in dieser Untersuchung mittels Pulsed-Field-Gelelektrophorese (PFGE). WALTHER und Mitarbeiter (2012) charakterisierten Coagulase-positive Staphylokokken aus Tupfern der Nasenhöhle von 108 gesunden Hunden und ihren Besitzern und kamen zu dem Schluss, dass das Zusammenleben mit Hunden einen möglichen Risikofaktor für die Besiedelung der menschlichen Nasenschleimhaut mit *Staph. pseudintermedius* darstellt. WEDLEY und Mitarbeiter (2014) sammelten in Tierarztpraxen im Vereinigten Königreich Nasentupfer von 724 Hunden und wiesen in 55,1% davon molekularbiologisch Staphylokokken nach.

Dabei handelte es sich in 1% der Fälle um Methicillin-resistente *Staph. aureus* (MRSA), bei 6,5% um Methicillin-sensible *Staph. aureus* und 5,5% Methicillin-resistente Coagulase-negative Staphylokokken. *Staph. pseudintermedius* wurde in keinem Fall nachgewiesen. Beim Patientenkollektiv in dieser Untersuchung handelte es sich allerdings nicht ausschließlich um gesunde Tiere.

#### 4.1.3. Sequenzierung

Im Gegensatz zu den zuvor erläuterten konventionellen Ansätzen konnte in Studien, die mit der Methodik der Sequenzierung arbeiteten, eine deutlich größere Vielfalt an Bakterien nachgewiesen werden, die die canine Nasenschleimhaut besiedeln. RODRIGUES HOFFMANN et al. (2014) schlossen in ihre Untersuchungen zum Mikrobiom der Haut beim Hund auch den mukokutanen Übergang im Bereich der Nasenlöcher von zwölf gesunden Tieren aus Privathaltung ein. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass diese Lokalisation von einer spezifischen mikrobiellen Gemeinschaft besiedelt ist, deren Beta-Diversität (ein Maß für den Unterschied in der mikrobiellen Komposition verschiedener Proben) sich signifikant von anderen untersuchten Stellen im Bereich der behaarten Haut unterscheidet. Sie ist außerdem durch einen niedrigeren Speziesreichtum und niedrigere Alpha-Diversitätsindices gekennzeichnet. Die Alpha-Diversität, ein Maß für die Diversität innerhalb einer individuellen Probe, wird mit der Anzahl der nachgewiesenen Spezies, dem Shannon-Diversitätsindex, der Häufigkeit und Gleichmäßigkeit einer Spezies berücksichtigt (RODRIGUES HOFFMANN et al., 2014), und dem Chao1-Index, der dazu dient, die tatsächliche Spezies-Diversität einer Probe abzuschätzen (CHAO, 1984), beschrieben. Nachgewiesen wurden 17 Bakterienphyla, wobei Proteobacteria dominierend waren, gefolgt von Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes und Cyanobacteria. Gammaproteobacteria stellten die am häufigsten in der Nase identifizierte Klasse dar. Die Familie *Moraxellaceae* war mit einer medianen relativen Häufigkeit von 33,1% in der Nase signifikant häufiger vertreten als an anderen Lokalisationen. Die Vertreter dieser Bakterienfamilie wurden der Spezies *Moraxella catharralis* zugeordnet.

Proteobacteria wurden auch in einer weiteren Studie, in der 16 gesunde Beagles einer Laborpopulation untersucht wurden, als Hauptbestandteil des caninen respiratorischen Mikrobioms identifiziert, wobei die relative Häufigkeit ihres Vorkommens vom oberen Respirationstrakt, also von der Nasenhöhle über den Oropharynx, zum unteren Respirationstrakt, gemessen in Bronchoalveolarlavage-

Flüssigkeit (BALF), zunimmt (ERICSSON et al., 2016). Weitere in der Nasenhöhle häufig identifizierte Phyla in dieser Untersuchung waren Firmicutes, Fusobacteria, Bacteroidetes, Tenericutes sowie Actinobacteria. Die in dieser Studie außerdem mittels Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States (PICRUST)-Software (LANGILLE et al., 2013) durchgeführte Analyse der genetischen Kapazität der aus dem Respirationstrakt isolierten Bakterien zeigt, dass sie in der Lage sind, Stoffwechselwege wie Glyoxylat- und Citratzyklus zu nutzen. Dies ermöglicht ihnen das Überleben in einer nährstoffarmen Umgebung wie den Atemwegen (ERICSSON et al., 2016).

In einer kürzlich veröffentlichten Studie von ISAIAH et al. (2017) wurde das nasale und orale Mikrobiom mehrerer gesunder Hundepopulationen mittels 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung verglichen. Auch in dieser Studie konnte eine sehr diverse bakterielle Gemeinschaft mit individuellen Unterschieden in der Nasenhöhle der Hunde nachgewiesen werden, die sich deutlich vom oralen Mikrobiom unterschied. Proteobacteria und Bacteroidetes wurden als Hauptbestandteile des Nasenmikrobioms bei den untersuchten Hunden identifiziert. Auf Gattungsebene waren *Moraxella*, *Leucobacter*, *Helcococcus* und *Cardiobacterium* signifikant häufiger dem nasalen als dem oralen Mikrobiom zuzuordnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde außerdem verglichen, inwieweit die geographische Lokalisation der Probanden Einfluss auf die mikrobielle Besiedelung hat. Dazu wurden Proben von Hunden einer Rasse (Labrador Retriever) aus zwei unterschiedlichen Populationen in zwei verschiedenen US-amerikanischen Bundesstaaten verglichen. Es zeigte sich eine auffällige Clusterbildung zwischen den jeweiligen Lokalisationen. Ein weiterer Aspekt in dieser Studie war der Vergleich der nasalen Mikrobiota von Spürhunden verschiedener Einsatzbereiche. Die Alpha-Diversität unterschied sich bei Rauschgift-, Sprengstoff- und Vapor Wake®-Spürhunden (d. h. Hunden, die darauf trainiert sind, Spuren von Sprengstoff in der Luft und an bewegten Objekten zu finden) nicht, einige bakterielle Taxa waren jedoch vermehrt mit den jeweiligen Einsatzbereichen assoziiert. Zusätzlich wurden in dieser Studie Proben eines Tierkollektivs zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass das nasale Mikrobiom innerhalb von sieben Wochen Veränderungen erfuhr, ohne dass sich die äußeren Bedingungen, unter denen die Tiere gehalten wurden, änderten. So war die Diversität zum späteren Zeitpunkt beim nasalen, nicht jedoch beim oralen Mikrobiom, höher, einige Taxa

unterschieden sich ebenfalls signifikant. Daraus schlossen die Autoren, dass das nasale Mikrobiom im Zeitverlauf einem stärkeren Wandel unterworfen ist als das orale Mikrobiom (ISAIAH et al., 2017).

#### **4.2. Mikrobielle Gemeinschaften in der Nasenhöhle erkrankter Hunde**

Die Beteiligung von Bakterien an nasalen Erkrankungen des Hundes wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals mittels Sequenzanalyse untersucht. Einige ältere Studien nutzten jedoch kultur-basierte oder traditionelle molekularbiologische Verfahren, um die nasalen Mikrobiota bei Hunden mit neoplastischen oder chronisch-entzündlichen Veränderungen der Nasenhöhle zu analysieren.

##### **4.2.1. Nasale Neoplasien**

Intranasale Tumore machen beim Hund etwa 1% der Neoplasien aus (MALINOWSKI, 2006). Als prädisponierende Faktoren werden Dolichozephalie, Luftverschmutzung in urbaner Umgebung sowie die Exposition gegenüber Schadstoffen aus Ölheizungen (BUKOWSKI et al., 1998) und Zigarettenrauch (REIF et al., 1998) im häuslichen Umfeld diskutiert. Das Durchschnittsalter erkrankter Hunde liegt bei 10 Jahren. Mittelgroße bis große Rassen sind etwas häufiger betroffen (MALINOWSKI, 2006). Männliche Tiere weisen eine leichte Prädisposition im Vergleich zu weiblichen Tieren auf (STUNZI & HAUSER, 1976). Symptome, die auftreten können, sind unilaterale Epistaxis, mukopurulenter Nasenausfluss, Deformation des Gesichtsschädels, Epiphora sowie neurologische Symptome bei Einbruch in das zentrale Nervensystem (OGILVIE & LARUE, 1992). Bei etwa zwei Dritteln der caninen Nasentumore handelt es sich um Karzinome, wobei Adenokarzinome, Plattenepithelkarzinome und undifferenzierte Karzinome vorkommen; des Weiteren treten Sarkome wie Fibrosarkome, Chondrosarkome, Osteosarkome und undifferenzierte Sarkome auf (MALINOWSKI, 2006). Seltener sind Ästhesioneuroblastome (BROSINSKI et al., 2012), Lymphome (KALDRYMIDOU et al., 2000) und Melanome (HICKS & FIDEL, 2006) beschrieben.

Veränderungen der Bakteriengemeinschaft bei Hunden mit Nasentumoren wurden unter anderem von LOBETTI (2009) untersucht. In Kulturen von Nasentupfern von 35 Hunden mit nachgewiesenen Tumoren der Nasenhöhle wurden bei 48% der Tiere keine Bakterien oder Pilze nachgewiesen, bei weiteren 48% wurden die angezüchteten Mikroorganismen der Normalbesiedelung zugerechnet, da sie bereits in vorangegangenen Untersuchungen in der Nasenhöhle des Hundes

beschrieben wurden und nur spärliches Wachstum auf der Kulturplatte beobachtet wurde. Welche bakteriellen Spezies im Einzelnen nachweisbar waren, wird nicht beschrieben. Nur bei einem einzelnen Hund wurde *Streptococcus canis* als pathogener Keim isoliert. WINDSOR und Mitarbeiter (2006) verglichen mittels qPCR den Gehalt an bakterieller DNA in Biopsieproben der nasalen Mukosa von Hunden mit lymphoplasmazellulärer Rhinitis, nasalen Neoplasien und sinonasaler Aspergillose. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Eine qualitative Bestimmung der Bakteriengemeinschaft mittels Kultur erfolgte in dieser Arbeit nur bei den Tieren mit lymphoplasmazellulärer Rhinitis, nicht jedoch in der Gruppe der nasalen Neoplasien.

#### **4.2.2. Chronisch-entzündliche Erkrankungen**

Die chronische Rhinitis des Hundes ist charakterisiert durch entzündliche Veränderungen der Nasenschleimhaut mit lymphoplasmazellulären oder neutrophilen Infiltraten, ohne dass ein ätiologischer Zusammenhang mit Neoplasien, Pilzinfektionen oder Reaktionen auf intranasale Fremdkörper erkennbar wäre (WINDSOR et al., 2004). Die Symptome umfassen typischerweise meist beidseitigen mukösen oder mukopurulenten Nasenausfluss, teilweise Epistaxis, Niesen und Reverse sneezing, während eine Obstruktion der Nasengänge und eine Deformierung des knöchernen Nasendachs eher bei intranasalen Neoplasien auftreten (WINDSOR & JOHNSON, 2006). In der Computertomographie stellen sich bei Hunden mit idiopathischer chronischer Rhinitis Sekretansammlungen im Bereich der Nasengänge, Opazifizierung des Weichteilgewebes sowie teilweise eine milde Destruktion der Nasenmuscheln dar (LEFEBVRE et al., 2005). Die Diagnose erfolgt mittels histologischer Untersuchung von Biopsien der Nasenschleimhaut (WINDSOR et al., 2004).

Die Ätiologie der chronischen lymphoplasmazellulären Rhinitis (LPR) des Hundes ist nach wie vor ungeklärt. Eine Beteiligung primärer pathogener Bakterien und Viren wurde in verschiedenen Studien untersucht. WINDSOR und Mitarbeiter (2006) führten eine PCR-Untersuchung zum Nachweis von *Chlamydophila* spp., *Bartonella* spp., *Mycoplasma* spp. sowie Caninem Adenovirus 2 (CAV-2) und Parainfluenzavirus 3 (PI-3) bei Hunden mit LPR, nasalen Neoplasien sowie nasaler Aspergillose durch. Keiner der Erreger wurde in den untersuchten Biopsieproben detektiert. HAWKINS und Mitarbeiter (2008) testeten 44 Hunde mit idiopathischer Rhinitis und 63 gesunde Kontrolltiere mittels indirektem Immunfluoreszenztest auf Antikörper gegen *Bartonella henselae* und



*Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii*, sowie mittels PCR auf Bartonella-DNA im Blut. Bei keinem der Hunde mit Rhinitis wurden Antikörper gegen oder DNA von Bartonellen nachgewiesen, in der Kontrollgruppe war je ein positiver Befund zu verzeichnen. Ein Fallbericht beschreibt das Auftreten einer chronischen Rhinitis bei einem Hund durch eine Infektion mit *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (PIVA et al., 2010).

Für wahrscheinlicher als primäre infektiöse Ursachen als Auslöser der caninen LPR wird von der Mehrheit der Autoren eine sekundäre Infektion der vorgeschädigten Nasenschleimhaut gehalten (GREENE & REINERO, 2006; WINDSOR & JOHNSON, 2006; COHN & REINERO, 2007; COHN, 2014). Dies wird auch als Erklärung herangezogen, warum eine antibiotische Behandlung bei Tieren mit chronischer Rhinitis in vielen Fällen vorübergehend zu einer Verbesserung der klinischen Symptome führt (COHN, 2014). WINDSOR und Mitarbeiter (2004) wiesen mittels kultureller Anzucht aus Biopsieproben bei neun von 15 Hunden mit LPR ein geringfügiges Bakterienwachstum nach, wobei bei fünf Proben jeweils eine Bakterienkolonie zu kultivieren war, bei vier Proben waren zwei oder mehr Bakterienkolonien nachweisbar. Es handelte sich dabei vorwiegend um *Staphylococcus* spp. (n = 4), *Pasteurella canis* (3), und *Corynebacterium* spp. (3). Andere Autoren beschreiben das Wachstum einer gemischten Bakterienpopulation, welche sie als physiologisch einordnen, in der unter anderem *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichia coli*, *Proteus*, *Pasteurella*, *Corynebacterium*, *Bordetella* und *Pseudomonas* vorhanden waren (NORRIS & LAING, 1985). In einer weiteren Studie von WINDSOR und Mitarbeitern (2006) wurde der Gesamtgehalt an bakterieller DNA in Biopsieproben bei Hunden mit LPR, nasalen Neoplasien und nasaler Aspergillose verglichen. Dieser unterschied sich nicht signifikant zwischen den drei Krankheitsgruppen, war jedoch im Vergleich zu gesunden Tieren erhöht. Als mögliche Erklärung führen die Autoren eine verminderte lokale Immunabwehr durch die Grunderkrankung sowie die Ansammlung von Mikroorganismen durch den in den oberen Atemwegen vorhandenen Mukus (sog. mucus trapping) an. Mithilfe klassischer bakteriologischer Untersuchung aus Nasentupferproben erhob LOBETTI (2014) bei zwölf von 33 Hunden mit histologisch diagnostizierter LPR einen negativen Befund, bei 21 Tieren wurden die angezüchteten Bakterien der physiologischen Normalbesiedelung zugerechnet, da sie nur dezentes Wachstum zeigten und/oder bereits in der Nasenhöhle gesunder Hunde beschrieben wurden. In einer vorangegangenen Arbeit desselben Autors (2009), in der die Ursache

chronischer nasaler Symptome bei 75 Hunden analysiert wurde, war bei neun von 15 Hunden mit lymphoplasmazellulärem Entzündungsmuster der Nasenschleimhaut eine normale Bakteriengemeinschaft kultiviert worden, bei sechs Tieren fiel die bakteriologische Untersuchung negativ aus. Kriterium für die Diagnose LPR war in dieser Studie neben dem histologischen Befund der fehlende Nachweis pathogener Bakterienspezies in der bakteriologischen Untersuchung von Tupferproben der Nasenhöhle. Bei Tieren mit einem histologisch neutrophilen oder pyogranulomatösen Zellbild wurde dagegen eine primäre bakterielle Rhinitis diagnostiziert. Bei diesen Probanden wurden *Actinomyces hordeivulneris*, *Actinobacillus*, *Corynebacterium amycolatum*, *Klebsiella pneumoniae* und *Streptococcus canis* nachgewiesen, die als pathogene Keime eingeordnet wurden.

Auch die ätiologische Beteiligung von Pilzen an der caninen LPR wird diskutiert. Für die chronische Rhinosinusitis des Menschen ist bekannt, dass Betroffene eine verstärkte humorale und zelluläre Immunantwort auf durch Luft übertragene Pilze, insbesondere die Schimmelpilzgattung *Alternaria*, aufweisen (SHIN et al., 2004). *Aspergillus* und *Penicillium* spp. sind als physiologische Bewohner der caninen Nasenhöhle bekannt (NORRIS & LAING, 1985). *Candida*, *Trichosporum* und *Cladosporidium* wurde bereits bei Hunden mit LPR nachgewiesen (WINDSOR & JOHNSON, 2006). Außerdem wurde bei Hunden mit LPR eine größere Menge an Pilz-DNA in Nasenschleimhautbiopsien festgestellt als bei gesunden Tieren oder bei Hunden mit nasalen Neoplasien (WINDSOR et al., 2006). Eine Studie zum Vorkommen von *Alternaria* und *Cladosporium* bei Hunden ohne nasale Erkrankungen, mit LPR und nasalen Neoplasien konnte geringe Mengen an DNA dieser Schimmelpilze in einem Teil der Schleimhautbiopsien nachweisen, ergab jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Die Autoren schlussfolgerten daher, dass *Alternaria* und *Cladosporium* zur physiologischen nasalen Bakteriengemeinschaft des Hundes gehören und nicht an der Entstehung chronischer Rhinitiden beteiligt sind (MERCIER et al., 2013).

Die erste Beschreibung der LPR beim Hund stufte die Erkrankung als immunmediert ein (BURGENER et al., 1987). Da die meisten betroffenen Tiere allerdings nur unzureichend auf immunsuppressive Therapie ansprechen, widersprechen andere Autoren dieser These (WINDSOR & JOHNSON, 2006).

Auch eine allergische Ätiologie der LPR wird kontrovers diskutiert. So konnte bei

drei Hunden mit Symptomen einer klinisch diagnostizierten allergischen Rhinitis gezeigt werden, dass die mononukleären peripheren Blutzellen eine erhöhte IL-4-Expression sowie eine erhöhte  $T_H2$ -Immunantwort bei Exposition gegenüber Hausstaubmilben-Antigen zeigten. Allerdings wurde bei diesen Hunden keine histologische Untersuchung der Nasenschleimhaut durchgeführt, weswegen eine lymphoplasmazelluläre Infiltration fraglich ist (KURATA et al., 2004). Experimentell lassen sich durch hochallergene Ragweed-Pollen Rhinitissymptome beim Hund auslösen (RUDOLPH et al., 2003). Da allerdings das Ansprechen auf Antihistaminika und Glukokortikoide von Hunden mit LPR unzureichend ist, wird eine Allergiebeteiligung bezweifelt (WINDSOR & JOHNSON, 2006).

### III. PUBLIKATION

#### **Bacterial Microbiome of the Nose of Healthy Dogs and Dogs with Nasal Disease**

Barbara Tress, Elisabeth S. Dorn<sup>1</sup>, Jan S. Suchodolski<sup>2</sup>, Tariq Nisar<sup>2</sup>,  
Prajesh Ravindran<sup>2</sup>, Karin Weber<sup>1</sup>, Katrin Hartmann<sup>1</sup>, Bianka S. Schulz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinic of Small Animal Medicine, LMU University of Munich, Munich,  
Germany

<sup>2</sup>Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences,  
College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M  
University, College Station, Texas, USA

Online veröffentlicht in „PLOS ONE“ am 01.05.2017

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736>

## RESEARCH ARTICLE

# Bacterial microbiome of the nose of healthy dogs and dogs with nasal disease

Barbara Tress<sup>1</sup>, Elisabeth S. Dorn<sup>1</sup>, Jan S. Suchodolski<sup>2</sup>, Tariq Nisar<sup>2</sup>, Prajesh Ravindran<sup>2</sup>, Karin Weber<sup>1</sup>, Katrin Hartmann<sup>1</sup>, Bianka S. Schulz<sup>1\*</sup>

**1** Clinic of Small Animal Medicine, LMU Munich, Munich, Germany, **2** Gastrointestinal Laboratory, Department of Small Animal Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Texas A&M University, College Station, Texas, United States of America

\* [b.schulz@medizinische-kleintierklinik.de](mailto:b.schulz@medizinische-kleintierklinik.de)

## Abstract

The role of bacterial communities in canine nasal disease has not been studied so far using next generation sequencing methods. Sequencing of bacterial 16S rRNA genes has revealed that the canine upper respiratory tract harbors a diverse microbial community; however, changes in the composition of nasal bacterial communities in dogs with nasal disease have not been described so far. Aim of the study was to characterize the nasal microbiome of healthy dogs and compare it to that of dogs with histologically confirmed nasal neoplasia and chronic rhinitis. Nasal swabs were collected from healthy dogs ( $n = 23$ ), dogs with malignant nasal neoplasia ( $n = 16$ ), and dogs with chronic rhinitis ( $n = 8$ ). Bacterial DNA was extracted and sequencing of the bacterial 16S rRNA gene was performed. Data were analyzed using Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME). A total of 376 Operational Taxonomic Units out of 26 bacterial phyla were detected. In healthy dogs, *Moraxella* spp. was the most common species, followed by *Phyllobacterium* spp., *Cardiobacteriaceae*, and *Staphylococcus* spp. While *Moraxella* spp. were significantly decreased in diseased compared to healthy dogs ( $p = 0.005$ ), *Pasteurellaceae* were significantly increased ( $p = 0.001$ ). Analysis of similarities used on the unweighted UniFrac distance metric ( $p = 0.027$ ) was significantly different when nasal microbial communities of healthy dogs were compared to those of dogs with nasal disease. The study showed that the canine nasal cavity is inhabited by a highly species-rich bacterial community, and suggests significant differences between the nasal microbiome of healthy dogs and dogs with nasal disease.



## OPEN ACCESS

**Citation:** Tress B, Dorn ES, Suchodolski JS, Nisar T, Ravindran P, Weber K, et al. (2017) Bacterial microbiome of the nose of healthy dogs and dogs with nasal disease. PLoS ONE 12(5): e0176736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736>

**Editor:** Hauke Smidt, Wageningen University, NETHERLANDS

**Received:** December 3, 2016

**Accepted:** April 14, 2017

**Published:** May 1, 2017

**Copyright:** © 2017 Tress et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** The sequences have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive under the accession number SRP092120.

**Funding:** The authors received no specific funding for this work.

**Competing interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Introduction

A highly diverse community of microorganisms colonizes human and animal bodies. Since next generation sequencing of 16S rRNA genes has been established as a method to characterize these communities, the understanding of interactions between bacteria and their host has considerably improved. For several organ systems, including gastrointestinal tract [1], skin [2], oral cavity [3], vagina [4], and recently nasal cavity [5], the microbiome of healthy dogs has been described. It was shown that in dogs with gastrointestinal disease, including

inflammatory bowel disease and acute diarrhea, alterations in the microbiome are associated with the underlying pathology [6, 7].

The role of bacterial communities in the pathophysiology of canine nasal disease is still unclear. In dogs with chronic rhinitis, bacteria have been discussed as primary or secondary pathogens, as in some patients, at least temporarily, clinical signs improve with antibiotic treatment [8]. In dogs with nasal neoplasia, bacteria are thought to be secondary pathogens, that can colonize the nasal mucosa because of reduced mucosal defense mechanisms [9].

In human medicine, several publications have described the nasal microbiome in healthy individuals [10, 11], and other studies investigated alterations of the bacterial population in patients with inflammatory or neoplastic diseases of the upper airways. Chronic rhinosinusitis in humans for example, is characterized by altered microbial composition and greater abundance of *Staphylococcus aureus* compared to healthy individuals [12]. Different bacterial profiles were also detected in patients with laryngeal carcinoma compared to a healthy control group. *Fusobacterium* and *Prevotella* species were more prevalent in the laryngeal area of these patients than in healthy people [13].

In veterinary medicine, several studies have been published using culture or PCR to investigate bacterial populations in the nasal cavity of dogs [14–16]. However, to date there are only few reports evaluating the nasal microbiome in dogs using next generation sequencing. One study focused on the skin microbiome, including the nostrils, in healthy and allergic dogs. This study revealed a lower species richness and a higher abundance of the family *Moraxellaceae* in the nostrils compared to other skin sites within a population of healthy dogs [2]. A recent study investigated the composition of the upper and lower airway microbiota in healthy dogs in relation to the fecal microbiota. This study illustrated rich microbial populations along the different sites of the canine respiratory tract with increasing relative abundance of *Proteobacteria* from the upper to the lower airways. Furthermore, analysis of the metabolic capacity of canine airway microbiota revealed that respiratory microbes possess the genetic capacity to utilize glyoxylate and citrate cycle metabolic pathways, which allows them to colonize nutrient-poor environments as the airways [5].

So far, there are no studies comparing the nasal microbiome of healthy dogs and dogs with nasal diseases. It is still unknown, if different microbiota possibly represent etiological agents in canine nasal disease. More detailed knowledge about bacterial populations in the dog's nose might help to understand the question, if microbial changes are primarily leading to a certain disease condition, or if microbial alterations develop secondary to reduced mucosal defense mechanisms, caused by the underlying disease. For the future, knowledge in this field might facilitate new treatment options, including the possibility to support beneficial bacterial groups instead of using antibiotics to repress bacteria colonizing the canine airways. Therefore, the aim of this study was to characterize the nasal microbiome of healthy dogs and compare it to the microbiome of dogs with nasal neoplasia and chronic rhinitis.

## Material and methods

### Ethics statement

The study was approved by the ethics committee of the Centre for Clinical Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, LMU Munich (number 25-30-04-2014).

### Study population

**Healthy dogs.** Twenty-three healthy dogs (median age 6.0 years, median body weight 15.4 kg) were included in the study (Table 1). All dogs were privately owned and had outdoor access. A history and physical examination were performed in each dog. For inclusion into the

Table 1. Study population: Signalement and number of dogs per household in healthy dogs.

Dog	breed	age	sex	weight (kg)	Cephalic index	number of dogs per household
H1	Mixed breed	1Y	FS	7.5	mes	1
H2	Mixed breed	2Y	FS	14.8	mes	1
H3	Beagle	10Y	FS	15.4	mes	4 <sup>A</sup>
H4	Australian Shepherd	2Y	FS	21.0	mes	4 <sup>A</sup>
H5	Weimaraner	6Y	FS	22.6	mes	1
H6	Mixed breed	4Y	FS	15.0	mes	1
H7	Mixed breed	11Y	M	9.5	mes	1
H8	German Shepherd	8Y	MN	39.0	dol	1
H9	Catahoula Leopard Dog	8Y	M	32.0	mes	2 <sup>B</sup>
H10	Catahoula Leopard Dog	4Y	FS	28.0	mes	2 <sup>B</sup>
H11	Mixed breed	6Y	M	25.8	mes	1
H12	Portuguese Podengo	8Y	FS	6.9	dol	4 <sup>A</sup>
H13	Cocker Spaniel	7Y	MN	16.5	mes	2 <sup>C</sup>
H14	Mixed breed	4Y	F	35.0	dol	2 <sup>C</sup>
H15	Golden Retriever	7Y	FS	27.0	mes	4 <sup>A</sup>
H16	Mixed breed	6Y	FS	6.0	mes	4 <sup>D</sup>
H17	Mixed breed	1Y	M	7.0	mes	4 <sup>D</sup>
H18	Papillon	3Y	M	5.0	mes	4 <sup>D</sup>
H19	Mixed breed	8Y	MN	12.0	mes	4 <sup>D</sup>
H20	Mixed breed	10Mo	F	18.0	mes	1
H21	Mixed breed	11Y	MN	10.0	dol	2 <sup>E</sup>
H22	Dachshund	3Y	F	7.0	dol	2 <sup>E</sup>
H23	Mixed breed	3Y	FS	20.0	mes	1

Y: years, Mo: months, M: male, MN: male neutered, F: female, FS: female spayed, mes: mesocephalic, dol: dolichocephalic,

<sup>A-E</sup>: dogs living together in the same household marked by the same letter

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.t001>

study, the dogs had to be without clinical and historical findings suggesting respiratory disease for at least three months prior to sample collection. In addition, dogs were only included if they had not been treated with antibiotic, anti-inflammatory or immunosuppressive drugs for at least four weeks prior to sampling. They had not received any intranasal vaccination during the last three months.

**Dogs with nasal disease: Nasal neoplasia.** Sixteen dogs with neoplasia of the nasal cavity (median age 9.0 years, median body weight 21.5 kg) were included in the study (Table 2). Malignant nasal neoplasia was diagnosed by histopathology of nasal biopsies. All dogs were client-owned and had outdoor access. Eleven dogs had not been treated with antibiotics at least within the last two weeks prior sample collection, five were receiving antibiotics at the time of sampling. Treatment with anti-inflammatory drugs was no exclusion criterion.

**Dogs with nasal disease: Chronic rhinitis.** Eight dogs with chronic rhinitis (median age 5.0 years, median body weight 19.9 kg) were included (Table 3). Histopathology of nasal tissue in these dogs revealed lymphoplasmacytic (n = 3) or neutrophilic (n = 5) inflammation. Only dogs were included that had no clinical, histological, or cultural evidence of other nasal diseases such as neoplasia, foreign body, or fungal infection. All dogs were client-owned and had outdoor access. Seven of the dogs had not been treated with antibiotics at least within two weeks prior to sample collection, one dog was receiving antibiotics at the time of sampling. Treatment with anti-inflammatory drugs was no exclusion criterion.

**Table 2. Study population: Signalement, underlying disease and medication of dogs with nasal neoplasia.**

dog	breed	age	sex	weight (kg)	histopathology	antibiotics	anti-inflammatory drugs
N1	Golden Retriever	12Y	MN	37.9	esthesioneuroblastoma	no	no
N2	Mixed breed	11Y	M	19.5	carcinoma	no	no
N3	Husky	2Y	M	19.4	esthesioneuroblastoma	no	no
N4	Saint Bernard	8Y	M	61.0	squamous cell carcinoma	no	no
N5	Mixed breed	8Y	FS	23.0	carcinoma	no	prednisolone
N6	Mixed breed	11Y	FS	6.9	carcinoma	no	no
N7	Labrador Retriever	12Y	M	35.3	squamous cell carcinoma	no	no
N8	Labrador Retriever	6Y	FS	32.0	lymphoma	no	prednisolone
N9	Mixed breed	11Y	F	30.0	osteosarcoma	no	no
N10	Coton de Tulear	14Y	M	8.8	carcinoma	no	meloxicam
N11	Chihuahua	9Y	M	2.5	carcinoma	no	no
N12	Mixed breed	9Y	FS	32.5	carcinoma	amoxi/clav	prednisolone
N13	Mixed breed	3Y	FS	20.0	osteosarcoma	amoxi/clav	no
N14	Mixed breed	13Y	F	13.0	osteosarcoma	amoxi/clav	prednisolone, metamizole
N15	Mixed breed	7Y	MN	37.4	transitional cell carcinoma	enrofloxacin	prednisolone, meloxicam
N16	Welsh Corgi	9Y	M	15.0	carcinoma	clindamycin	meloxicam

Y: years, Mo: months, M: male, MN: male neutered, F: female, FS: female spayed

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.t002>

### Sample collection

Two nasal swabs were collected from each dog. For that purpose, a sterile dry rayon swab (Copan<sup>®</sup> sterile dry swab 155C, Brescia, Italy) was inserted into each nostril and rotated carefully. In the population of healthy dogs, sample collection was performed while the dogs were awake. In the diseased dogs, samples were collected while patients were under general anesthesia before the rhinoscopy procedure was started. All swabs were frozen at -80 °C until further analysis.

### DNA extraction

Extraction of the genomic DNA was performed from pooled sets of swabs collected from each dog using a QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as recommended by the manufacturer and described previously [17].

**Table 3. Study population: Signalement, underlying disease and medication of dogs with chronic rhinitis.**

dog	breed	age	sex	weight (kg)	histopathology	antibiotics	anti-inflammatory drugs
CR1	Old English Sheepdog	3Y	M	43.9	purulent	no	no
CR2	Mixed breed	13Y	FS	7.2	purulent	no	no
CR3	Mixed breed	6Y	F	12.1	ulcerous, necrotizing, granulomatous	no	no
CR4	West Highland White Terrier	2Y	FS	6.6	purulent	no	no
CR5	Prager Rattler	5Mo	F	2.3	purulent	no	no
CR6	Rhodesian Ridgeback	4Y	MN	44.0	purulent	no	no
CR7	Golden Retriever	8Y	M	29.5	lymphoplasmacytic, granulomatous	no	no
CR8	Golden Retriever	8Y	F	27.7	lymphoplasmacytic, eosinophilic	clindamycin, doxycycline	no

Y: years, Mo: months, M: male, MN: male neutered, F: female, FS: female spayed

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.t003>



Briefly, for lysis of bacteria, swabs were placed in 2 ml phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.1% NaN<sub>3</sub>, and were incubated at room temperature for three hours. Swabs were removed and the buffer solution was centrifuged at 7500 rpm for ten minutes (using an Eppendorf Centrifuge 5417R, Hamburg, Germany). After removal of the supernatant and resuspension in 180 µl ATL buffer, the pellet was transferred into a tube with 20 µl proteinase K and incubated at 56°C and 700rpm for one hour (using an Eppendorf Thermomixer Comfort, Hamburg, Germany). Then, 200 µl AL buffer were added and samples were incubated at 70°C for ten minutes. After adding 200 µl of ethanol, samples were transferred into QIAamp Mini spin columns to bind the bacterial DNA. DNA from the two swabs per animal was pooled during this step of the extraction procedure. Afterwards, DNA was washed in two steps following the manufacturer's instructions. To elute the DNA, 100 µl AE buffer were added on the filter inside the microcentrifuge tube, which then were incubated at room temperature for five minutes and centrifuged at 8000 rpm for one minute. Extracted DNA was frozen at -80°C until further analysis.

### Sequencing

Sequencing of the 16S rRNA gene V4 variable region was performed at MR DNA ([www.mrdnalab.com](http://www.mrdnalab.com), Shallowater, TX, USA) on an Illumina MiSeq platform following the manufacturer's guidelines, using forward and reverse primers: 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') and 806R (5'-GGACTACVSGGGTATCTAAT-3'), as described previously [18].

After sequencing, primers and barcodes were removed from the sequences, short, ambiguous, homopolymeric and chimeric sequences were depleted from the dataset using the QIIME (Quantitative Insights Into Microbial Ecology) v1.8 pipeline [19]. Operational Taxonomic Units (OTUs) were assigned based on at least 97% sequence identity using QIIME. The sequences have been deposited in the NCBI Sequence Read Archive under the accession number SRP092120.

### Data analysis

A total of 4,088,256 sequences was amplified throughout all the samples from healthy and diseased dogs. Minimum were 43,193 sequences in one sample, maximum were 135,315 sequences, with a mean of 83,433 sequences (median 83,526). To account for unequal sequencing depth, subsequent analysis was performed on a subset of 43,193 sequences per sample, which is the lowest depth within the samples.

The compiled data were used to determine the relative percentages of bacteria for each individual sample. Alpha and beta diversity measures were calculated and Principle Coordinates Analysis (PCoA) plots and rarefaction curves were generated using the software QIIME v1.8 (Knight and Caporaso Labs, Arizona, USA).

Alpha diversity, a measurement for the diversity of an individual sample, can be described by the number of observed species, the Shannon diversity index, which takes into account abundance and evenness of species [2], and the Chao1 index, which calculates the estimated true species diversity of a sample [20]. To evaluate the beta diversity, a measurement for differences in microbial compositions between different samples, both the weighted UniFrac analysis, which accounts for relative abundance of sequences in different environments, and unweighted, which does not account for relative abundance, were performed.

PCoA plots were investigated for clustering by visual assessment. Factors that were taken into consideration were individual (sex, breed, age, body weight and cephalic index, classified in mesocephalic or dolichocephalic, based on breed or phenotypically suspected breed) and environmental (number of dogs per household) characteristics in the healthy dogs (Table 1),

and individual factors (sex, breed, age, body weight, pretreatment with antibiotics, prednisolone, NSAIDs, histopathological diagnosis) in the diseased dogs (Tables 2 and 3). Differences in bacterial communities between healthy dogs and dogs with nasal disease were analyzed using the phylogeny-based unweighted UniFrac distance metric. This analysis measures the phylogenetic distance among bacterial communities in a phylogenetic tree, and thereby provides a measure of similarity among microbial communities present in different biological samples [21]. ANOSIM (Analysis of Similarity) within the software package PRIMER 6 (PRIMER-E Ltd., Luton, UK) was used on the unweighted UniFrac distance matrix to determine significant differences in microbial communities between the different groups. P values <0.05 were considered statistically significant. To elucidate whether dogs, which were living together in the same household, had closer similarities within their microbial communities, average distances between individual animals were calculated using the unweighted UniFrac file using the method ANOSIM with 999 permutations. Thus, the distances between individuals living together were compared to those of dogs living separately.

Statistical analysis of individual factors (age, body weight) and alpha diversity indices were performed using the software package PRISM (PRISM 6, GraphPad Software Inc., San Diego, USA). To avoid influence of confounding factors, dogs with antibiotic pretreatment were excluded from statistical analysis for investigations other than the comparison of pretreated and untreated patients. As in other species, like pigs, an influence of age on the nasal microbiota has been shown [22], dogs under 12 months of age were also excluded from statistical analysis except age-related statistics.

Because the data were assumed to be not normally distributed, a non-parametric Mann-Whitney test was used for statistical comparison between healthy and diseased dogs. A non-parametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's Multiple Comparison post-test was performed to compare individual factors and alpha indices for the three groups healthy, nasal neoplasia, and chronic rhinitis. To determine which disease types were significantly different with regard to these factors, an additional pairwise test using PRIMER 6 was used. P values <0.05 were considered statistically significant.

Linear discriminant analysis effect size (LEfSe) was used to elucidate bacterial taxa (16S rRNA genes) associated with healthy or diseased dogs. LEfSe was used online in the Galaxy workflow framework (<https://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>).

Differences in the proportions of bacterial taxa between healthy and diseased dogs were investigated using a non-parametric Kruskal-Wallis test, using the statistical package JMP Pro 11 (SAS, Marlow, Buckinghamshire). Resulting p-values were corrected for multiple comparisons using the Benjamini & Hochberg False Discovery Rate [23]. A Dunn's Multiple Comparisons post-test was used to determine which disease types were significantly different.

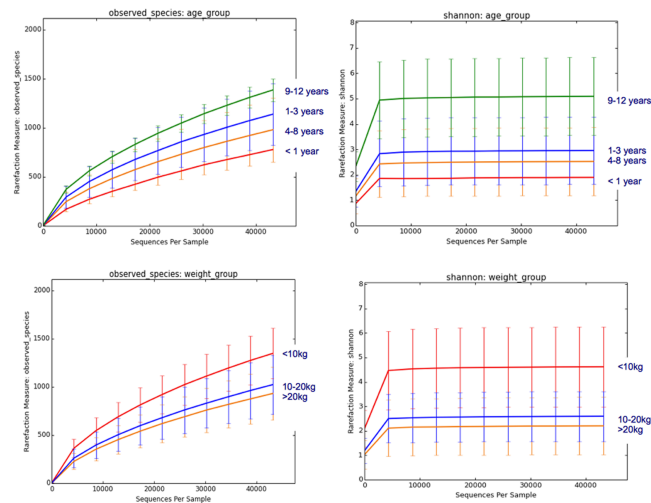
## Results

### Animal population

A significant difference ( $p = 0.015$ ) was observed concerning age between healthy dogs ( $5.4 \pm 3.2$  years) and those with nasal neoplasia ( $9.1 \pm 3.4$  years), but not between healthy dogs and dogs with chronic rhinitis ( $5.6 \pm 4.1$  years). No significant difference in body weight was identified between healthy dogs ( $17.5 \pm 9.9$  kg) and dogs with nasal tumors ( $24.6 \pm 14.8$  kg) or chronic rhinitis ( $21.7 \pm 16.9$  kg).

### Nasal microbiome of healthy dogs

**Nasal microbial composition.** Investigating PCoA plots, no clustering, based on similarities of bacterial molecular phylogenetic trees, was observed when comparing sex, age group



**Fig 1. Rarefaction analysis of 16S-rRNA gene sequences obtained from healthy dogs, comparing different age and body weight groups.** Lines represent the mean and error bars represent standard deviations. Shannon diversity index and number of observed species are higher in dogs older than 9 years and in dogs with a body weight of less than 10kg.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.g001>

(< 1 year, 1–3 years, 4–8 years, 9–12 years, > 12 years), body weight group (< 10 kg, 10–20 kg, > 20 kg) or cephalic index between groups. This was confirmed with statistical testing using ANOSIM on the unweighted UniFrac distance metric, which showed no significant differences for these comparisons (sex:  $p = 0.151$ ,  $R = 0.012$ , age group:  $p = 0.320$ ,  $R = 0.035$ , body weight group:  $p = 0.05$ ,  $R = 0.121$ , cephalic index:  $p = 0.739$ ,  $R = -0.091$ ).

Calculation of average distances using the unweighted UniFrac distance metric showed no closer similarity of microbial communities between dogs living together in one household when compared to dogs living separately.

**Species richness and diversity.** A rarefaction analysis was performed to evaluate species richness. For different age groups and different weight groups significant differences between single groups could be demonstrated (Fig 1). Dogs older than 9 years (age group 4) had a significantly higher Shannon diversity index than younger dogs (age group 3, 4–8 years old) (ANOVA with following Tukey test,  $p = 0.036$ ). Differences in number of observed species and Chao1 were not significant. Considering different weight groups, dogs with a body weight of less than 10 kg had a significantly higher Shannon diversity index ( $p = 0.017$ ) and number of observed species ( $p = 0.041$ ) than dogs with a body weight over 10 kg. Chao1 did not differ significantly. Other factors like breed or time of the year, when the animal was sampled, were too variable to be evaluated statistically.

Good's coverage was higher than 0.97 in all samples at the chosen sequencing depth of 43,190 sequences. This allows to conclude that all the samples have a sufficiently high number of sequences and enough coverage, and all animals were equally sampled.

**Most common taxa colonizing the nasal cavity of healthy dogs.** A total of 26 bacterial phyla was detected in the samples from the nasal cavity of healthy dogs. Most abundant phylum was *Proteobacteria* (mean 83.4%, min 37.4%—max 98.5%), followed by *Firmicutes* (4.8%, 0.4–20.8%), *Bacteroidetes* (2.6%, 0.1–12.5%), *Cyanobacteria* (2.1%, 0.0–11.6%), and *Actinobacteria* (2.1%, 0.1–8.6%) (Table 4). Other phyla, like *Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, *Planctomycetes* and GN02 were detected in smaller amounts and only in a few animals.

At class level, *Gammaproteobacteria* were most commonly detected, followed by *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, and *Bacilli*. Most frequently detected family was *Moraxellaceae* (phylum *Proteobacteria*, class *Gammaproteobacteria*, order *Pseudomonadales*) (Fig 2). *Moraxella* was the genus which was identified predominantly in most of the samples of healthy dogs. This genus was detected in all samples, and represented 59.2% of the total taxa in healthy dogs, with a range of 1.5% to 95.6%. Other frequently identified genera were *Phyllobacterium* (3.4%, 0.1–12.8%), not specified genera of the family *Cardiobacteriaceae* (2.1%, 0.0–69.1%), and *Staphylococcus* (1.7%, 0.0–15.3%); however, these genera were predominantly represented only in few individuals.

Throughout all samples, 376 different OTUs were detected, but DNA of most of the highly abundant taxa could not be resolved beyond genus level.

### Nasal microbiome of healthy dogs compared to diseased dogs

**Nasal microbial communities in healthy versus diseased dogs.** Clustering in the PCoA plots between microbial communities of healthy and diseased dogs was observed. While healthy dogs formed a cluster, and dogs with nasal neoplasia formed another cluster, microbial communities in dogs with chronic rhinitis were more scattered (Fig 3). In ANOSIM analysis a significant difference could be verified when comparing healthy and diseased dogs ( $p = 0.027$ ,  $R = 0.101$ ). Pairwise test using PRIMER6 suggested that healthy dogs and dogs with nasal neoplasia differed significantly ( $p = 0.033$ ) in microbial community composition. Between healthy dogs versus dogs with chronic rhinitis ( $p = 0.590$ ) and dogs with chronic rhinitis versus dogs with nasal neoplasia ( $p = 0.390$ ) no significant difference was verified.

Most of the individual factors (sex, breed, age, body weight, pretreatment with antibiotics, prednisolone, NSAIDs, histopathological diagnosis) were highly variable. Due to the resulting small sample size, statistical comparison of male and female dogs, different age groups, different groups of body weight, and patients with different histological diagnoses within the group of either neoplasia or chronic rhinitis, was not performed. There was no clustering observed, assessing the PCoA plots of microbial communities, with exception of antibiotic treatment within the group of dogs with nasal neoplasia.

Within the group of dogs with nasal neoplasia, bacterial communities of patients with and without antibiotic treatment were compared statistically. The microbial communities of pretreated dogs were marginally distributed compared to untreated dogs (Fig 4A), but this was not significant based on ANOSIM of unweighted UniFrac distance metrics ( $p = 0.149$ ,  $R = 0.136$ ). Although there was no significant difference demonstrated for  $\beta$ -diversity, several significantly different bacterial taxa could be detected using LEfSe (Fig 4B). While the genera *Planctomyces* and *Sphingobium* and the family *Parachlamydiaceae* were significantly more represented in dogs that had received antibiotics within the last two weeks, the family *Gemellaceae* was associated with dogs without antibiotic treatment.

**Species richness and diversity.** Diversity analysis was performed to compare the number of observed species, Shannon diversity index, Chao1 between healthy and diseased dogs. Statistical analysis of these parameters showed no significant differences between the groups for number of observed species and Chao1. Shannon diversity index was lower for the healthy

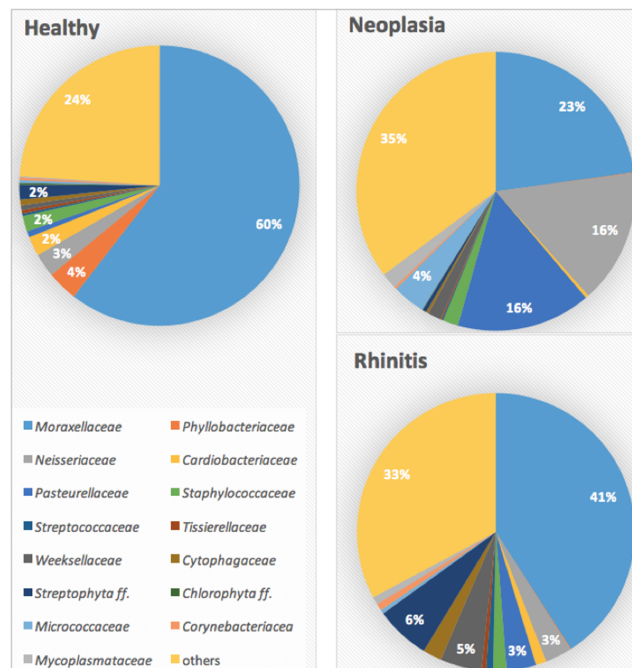
**Table 4. Taxa present at >1% mean relative abundance in healthy and diseased dogs.** Mean relative percentages and standard deviation of the most abundant bacterial groups, annotated to the level of phylum, family and Operational Taxonomic Unit (OTU), based on sequencing of the 16S rRNA.

Taxon	healthy		neoplasia		rhinitis		Kruskal Wallis p-value	q-value **
	mean * %	SD %	mean %	SD %	mean %	SD %		
<b>phylum</b>								
<b>family</b>								
<b>OTU</b>								
<b>Proteobacteria</b>	82.8	14.8	72.4	29.3	64.3	20.4	0.133	0.448
Moraxellaceae	60.5 <sup>a</sup>	30.4	22.8 <sup>b</sup>	29.0	40.9 <sup>ab</sup>	32.7	<b>0.006</b>	0.323
<i>Moraxella</i> spp.	58.0 <sup>a</sup>	30.2	14.9 <sup>b</sup>	21.5	33.8 <sup>ab</sup>	31.5	<b>0.001</b>	0.188
Phyllobacteriaceae	3.5	14.7	0.1	0.0	0.1	0.1	0.239	0.690
<i>Phyllobacterium</i> spp.	3.5	14.7	0.1	0.0	0.1	0.0	0.573	0.813
Neisseriaceae	2.7	5.8	15.5	18.4	3.1	3.3	0.077	0.545
<i>Conchiformibius</i> spp.	0.9	1.5	9.5	15.9	1.8	2.2	0.429	0.740
Cardiobacteriaceae	2.3	3.6	0.4	0.6	1.2	2.5	0.039	0.457
Polyangiaceae	1.4	6.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.051	0.457
Comamonadaceae	1.3	2.6	1.4	2.0	0.9	1.0	0.927	0.991
Pasteurellaceae	0.7 <sup>a</sup>	0.8	15.6 <sup>b</sup>	20.1	3.4 <sup>ab</sup>	4.1	<b>0.019</b>	0.457
<i>Pasteurella multocida</i>	0.1 <sup>a</sup>	0.1	2.5 <sup>b</sup>	6.5	0.0 <sup>ab</sup>	0.0	<b>0.004</b>	0.209
Xanthomonadaceae	0.2	0.2	3.3	6.9	0.4	0.3	0.206	0.669
Pseudomonadaceae	0.4	0.8	2.0	3.5	1.1	1.5	0.339	0.723
Alcaligenaceae	0.5	0.7	1.0	1.4	1.4	1.7	0.601	0.833
Enterobacteriaceae	0.2	0.3	1.0	2.5	0.4	0.4	0.392	0.747
Sphingomonadaceae	0.8	0.7	0.3	0.5	2.4	4.5	0.119	0.597
Oxalobacteraceae	0.3	0.5	0.5	0.9	1.6	2.9	0.661	0.881
Acetobacteraceae	0.1 <sup>a</sup>	0.2	0.0 <sup>b</sup>	0.0	1.1 <sup>ab</sup>	2.1	<b>0.041</b>	0.457
<b>Firmicutes</b>	4.9	6.2	7.2	8.7	4.7	3.4	0.359	0.554
Staphylococcaceae	1.8	4.4	1.8	2.9	1.6	1.7	0.816	0.963
[order] Clostridiales	0.1	0.1	1.5	4.8	0.0	0.0	0.145	0.600
<b>Bacteroidetes</b>	2.8	3.3	5.5	7.2	11.6	11.4	0.127	0.448
[Weeksellaceae]	0.6	1.0	1.6	1.7	4.8	10.9	0.246	0.690
Porphyromonadaceae	0.2	0.6	1.1	3.6	0.4	0.5	0.296	0.723
Chitinophagaceae	0.9	1.6	1.1	1.4	4.0	6.7	0.540	0.826
Cytophagaceae	0.7	0.9	0.3	0.4	2.2	2.2	0.222	0.672
<b>Cyanobacteria</b>	2.1	3.4	0.6	1.0	7.1	7.7	0.315	0.531
[order] Streptophyta	1.7	3.3	0.5	1.0	6.4	7.2	0.303	0.723
<b>Actinobacteria</b>	2.1	2.1	6.0	10.8	3.8	3.8	0.750	0.843
Microbacteriaceae	0.5	0.6	1.3	3.7	0.3	0.3	0.192	0.669
<i>Leucobacter</i> spp.	0.3	0.4	1.2	3.7	0.1	0.1	0.097	0.602
Micrococcaceae	0.3	0.6	3.8	10.3	0.4	0.6	0.262	0.716
<b>GN02</b>	1.9	3.0	1.3	1.6	0.7	1.1	0.253	0.531
[class] BD1-5	1.9	3.0	1.3	1.6	0.7	1.1	0.204	0.669
<b>Spirochaetes</b>	0.0	0.0	1.5	4.7	0.0	0.0	0.130	0.448
Spirochaetaceae	0.0	0.0	1.3	4.4	0.0	0.0	0.052	0.457
<i>Treponema</i> spp.	0.0	0.0	1.3	4.4	0.0	0.0	0.052	0.598
<b>Tenericutes</b>	0.1	0.2	2.0	5.5	0.9	1.6	0.395	0.554
Mycoplasmataceae	0.1	0.2	1.9	5.5	0.9	1.6	0.840	0.964
<i>Mycoplasma</i> spp.	0.1	0.2	1.9	5.5	0.9	1.6	0.856	0.915

\*a, b: Means not sharing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ , Dunn's multiple comparison test).

\*\* q-values adjusted based on the Benjamini & Hochberg False discovery rate

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.t004>



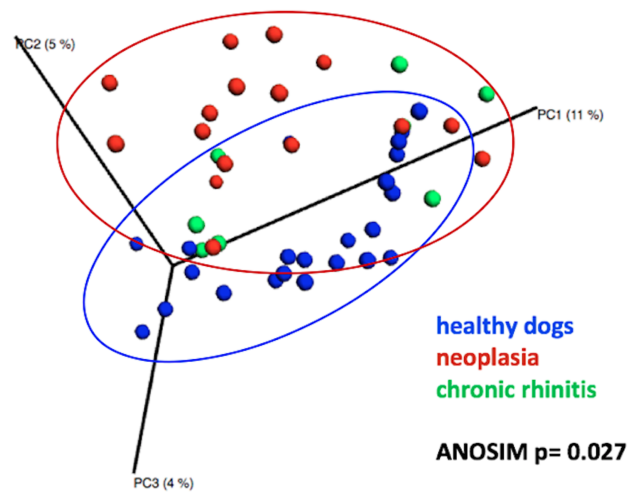
**Fig 2. Bacterial families in healthy and diseased dogs.** Mean values of most common bacterial families in the nasal cavity of healthy dogs, dogs with nasal neoplasia and chronic rhinitis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.g002>

dogs than for the diseased dogs (Kruskal-Wallis test,  $p = 0.038$ ), but the difference was not statistically significant when comparing the three groups, healthy dogs versus nasal neoplasia versus chronic rhinitis, in the following Dunn's multiple comparison test (Fig 5).

#### Most common taxa colonizing the nasal cavity of healthy compared to diseased dogs.

In dogs with nasal neoplasia, *Moraxella* spp. was the most abundant finding on genus level, as it was in healthy dogs, but accounted for only 15.3% of the total taxa (min. 0.7%–max. 61.1%). This difference was statistically significant ( $p = 0.001$ ). The proportions of the family *Pasteurellaceae* (phylum *Proteobacteria*, class *Gammaproteobacteria*, order *Pasteurellales*) were different between healthy and diseased dogs. This bacterial family accounted for 12.9% (0.1–64.3%) of the total taxa and was significantly higher represented in dogs with neoplasia ( $p = 0.019$ ) (Figs 2 and 6). *Haemophilus parainfluenza* ( $p = 0.018$ ) and *Pasteurella multocida* ( $p = 0.004$ ) were representatives of this family that were significantly more common in dogs with nasal neoplasia than in healthy dogs. Other common genera in dogs with nasal neoplasia included *Conchiformibius* spp. (9.5%, 0.1–49.9%,  $p = 0.429$ ) (phylum *Proteobacteria*, family *Neisseriaceae*) and non-specified genera of the families *Neisseriaceae* (5.9%, 0.1–54.5%,  $p = 0.080$ ) and

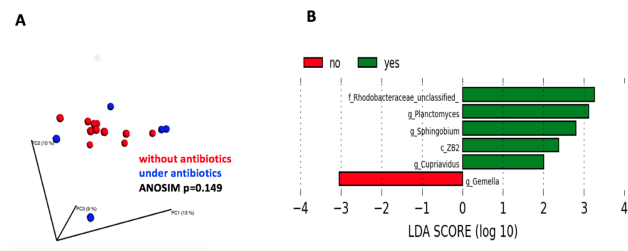


**Fig 3. Principal coordinate analysis (PCoA) of unweighted UniFrac distances of 16S rRNA genes (3D).** Similarities in microbial communities in healthy dogs, dogs with nasal neoplasia and chronic rhinitis. Clustering is observed between healthy dogs and dogs with nasal neoplasia, but not in dogs with chronic rhinitis.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.g003>

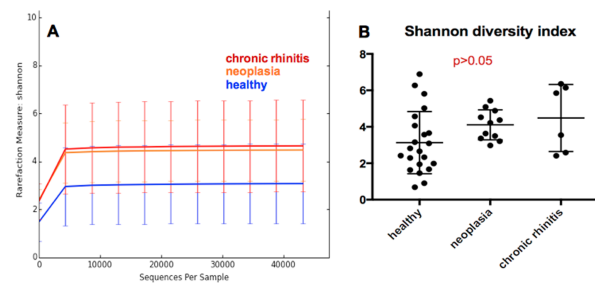
*Micrococcaceae* (3.2%, 0.1–34.8%,  $p = 0.480$ ); however, these were not more commonly detected than in healthy dogs.

Analysis of individual bacterial groups based on LDA effect size (LEfSe) observed alterations in several taxa when dogs with nasal neoplasia were compared to healthy dogs (Fig 7). Dogs with nasal tumors showed significantly decreased relative abundance of *Moraxella* spp.



**Fig 4. Differences in microbial communities in dogs with nasal neoplasia depending on antibiotic treatment.** PCoA plots of microbial communities in dogs with nasal neoplasia without and under antibiotic treatment (A), bacterial taxa significantly higher represented in dogs with (green) and without (red) antibiotic treatment showed by linear discriminant analysis (LDA) scores based on LEfSe (B).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.g004>



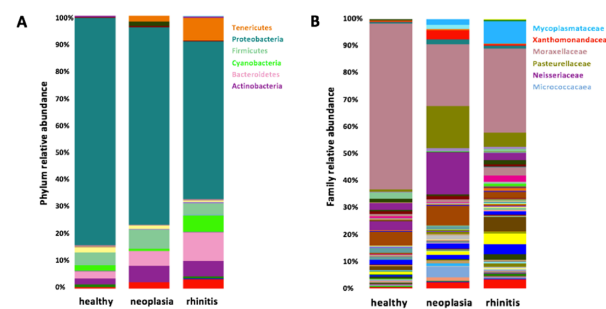
**Fig 5. Rarefaction curve and statistical evaluation of Shannon diversity index.** Shannon diversity index is lower in healthy dogs (blue) than in dogs with chronic rhinitis (red) or nasal neoplasia (orange) (dogs with antibiotic pre-treatment excluded) (A). The difference is not significant in a Dunn's multiple comparison test (B).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.g005>

( $p = 0.001$ ) and *Cardiobacteriaceae* ( $p = 0.039$ ), while *Pasteurella* spp. ( $p = 0.004$ ) was significantly increased.

The nasal cavity of dogs with chronic lymphoplasmacytic or neutrophilic rhinitis was also predominantly colonized by *Moraxella* spp. (34.5%, 0.7–77.3%), followed by the order *Streptophyta* (6.4%, 0.0–16.6%), the genus *Riemerella* spp. (4.4%, 0.0–25.3%), and the family *Pasteurellaceae* (2.9%, 0.2–17.1%) (Figs 2 and 6).

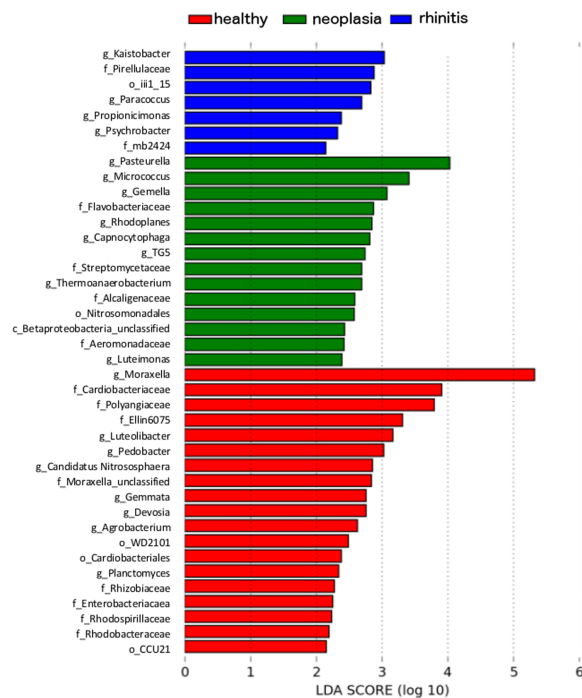
When individual bacterial groups were analyzed by LEfSe, a significant difference between healthy dogs and dogs with chronic rhinitis could be observed for several taxa, including *Kaistobacter* spp. (0.3%, 0.0–1.1%,  $p = 0.036$ ) and *Pirellulaceae* (0.2%, 0.0–0.9%,  $p = 0.049$ ) (Fig 7). However, these accounted for only a small percentage of the total taxa (<0.3%) and only for single animals. *Mycoplasma* spp. were considerably more abundant in several individual dogs with chronic rhinitis, especially in the sample of one young dog with chronic rhinitis (61.8%)



**Fig 6. Composition of the nasal microbiome in healthy and diseased dogs.** Bar charts showing relative abundance of all taxa detected in nasal swabs of dogs, annotated to the taxonomic level of phylum (A) and family (B).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.g006>





**Fig 7. Different relative abundance of bacterial taxa between healthy and diseased dogs.** Bacterial taxa at different taxonomic levels (c = class, o = order, f = family, g = genus) with significantly different mean relative abundance in dogs with chronic rhinitis (blue), nasal neoplasia (green) and healthy dogs (red), ranked according to their effect size determined by LDA score, based on LEfSe.

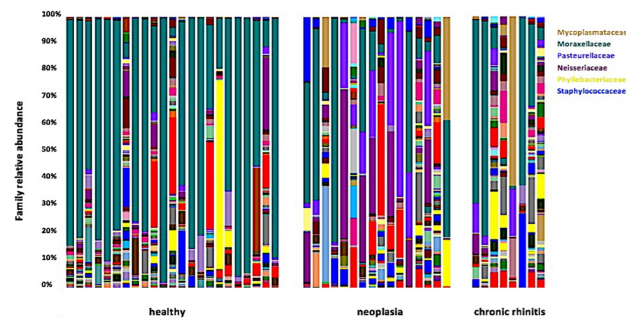
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.g007>

(Fig 8), but since dogs under 12 months of age were excluded from other than age-related statistical analysis, this dog was not included in the comparison.

All taxa that differ between groups, are listed in the supporting information (S1 Table).

## Discussion

The study demonstrates that the canine nasal cavity is inhabited by a species-rich bacterial community. In agreement with previous investigations, which used next-generation sequencing methods for bacterial analysis, the nasal microbiome of healthy dogs was shown to be dominated by *Moraxellaceae*, especially *Moraxella* spp., followed by several other bacterial families at considerably lower levels [2, 5]. Possible reasons for a different order of the detected taxa, if sorted based on abundance, could be the selection of study subjects. While in one of the previous studies [5] samples from a uniform cohort of research animals were used, the present



**Fig 8. Individual family-level composition of the nasal microbiome in healthy and diseased dogs.** Bar charts showing relative abundance of all taxa (annotated to the taxonomic level of family) detected in nasal swabs of dogs. Each bar chart represents one dog.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176736.g008>

study included a heterogeneous group of pet dogs for analysis. The different genetic and environmental background of these populations could be a confounding factor.

Several bacterial taxa isolated in this study have been described for the first time since next-generation sequencing methods complement culture-based methods. These bacteria have never been associated with the dog's nasal cavity before. Many of these bacteria cannot be cultured so far, because they are highly adapted to their particular microenvironment, which is difficult to reproduce under laboratory conditions [24]. Some have been known as being part of the canine microbiome, such as *Porphyromonas*, GN02, or *Conchiformibius* in the oral cavity [25, 26]. Other taxa have been detected in soil or water samples before [27, 28]; thus, it is likely that these bacteria were obtained from the environment, as the nares are very exposed to a dog's outdoor environment.

In previous studies, in which culture-based methods were used, a much lower number of bacterial taxa were identified in the canine nose compared to recent investigations using pyrosequencing methods. In healthy dogs, *Staphylococci*, *Streptococci*, *Acinetobacter*, and *Enterococci* were hypothesized to be the main components of the nasal microbiota [14, 29, 30]. Predominant taxa detected using next generation sequencing, such as *Moraxella* spp., did not occur in the results obtained by culturing methods.

In human medicine, there are several studies investigating the nasal microbiome of healthy as well as diseased individuals based on 16S rRNA sequencing. Different microbiomes for different sites in the upper airways have been described [10, 31]. In humans, *Actinobacteria* and *Firmicutes* accounted for the majority of nasal bacteria, with a lower prevalence of *Proteobacteria*. Therefore, there seem to be considerable differences between the nasal bacterial communities of different species.

In veterinary medicine, only few reports exist about microbial colonization of the upper airways in dogs with nasal disease. The present study is the first one to investigate nasal microbiota in dogs with nasal disease using next-generation sequencing methods. Bacteria of the upper respiratory tract of dogs with respiratory signs have been examined using cultural methods before [32]. Most frequently isolated bacteria were *Staphylococcus intermedius*, *E. coli*,  $\alpha$ -hemolyzing *Streptococcus*, and *Pasteurella multocida*, which were all not considered primary pathogens, but probably originating from the normal bacterial community. With exception of

*E. coli*, these bacteria could also be found in the present study population, but accounted only for a minor proportion of the microbiota in healthy and diseased animals. While different species of *Staphylococcus* and *Pasteurella* were detected at low levels in most of the animals, *Streptococcus* occurred only in a small number of dogs.

In another study, bacterial cultures of dogs with nasal neoplasia and lymphoplasmacytic rhinitis were examined. An equal distribution between negative culture results and bacteria that were considered normal flora was detected in both groups; however, the definition of “normal microflora” was based on data obtained from the literature [33].

Nasal biopsies from dogs with lymphoplasmacytic rhinitis (LPR), nasal neoplasia, and aspergillosis have been examined for bacterial and fungal DNA using polymerase chain reaction in a previous work [16]. No difference in DNA load for bacterial DNA could be demonstrated between disease groups. Furthermore, no bacterial taxa which have been associated with upper respiratory tract disease in several species, like *Bartonella*, *Mycoplasma*, or *Chlamydia* [34–36], could be detected in any biopsy. However, in the present study facultative pathogens such as *Mycoplasma* spp. were also only detected in very small numbers.

The present study was able to demonstrate alterations of the nasal microbiome of dogs with nasal neoplasia as well as chronic rhinitis compared to healthy dogs. Most noticeable findings were the decreased abundance of *Moraxellaceae* and higher abundance of *Pasteurellaceae* in diseased dogs. Also, the family *Neisseriaceae* was apparently more common in some of the individuals affected by nasal neoplasia (Fig 7), although this difference was not statistically significant for all the dogs. So far it is not possible to elucidate, whether these alterations play a role in the etiology of the disease process or rather represent consequences of a primary disease. One conceivable mechanism could be bacterial overgrowth with certain taxa, enabled by immune modulation caused by the underlying disease. However, some of the bacteria found in the present study are known to be capable to subvert their host's immune system. In toxigenic strains of *Pasteurella multocida* the protein toxin PMT is found, which acts as a strong mitogen, protects from apoptosis and has an impact on the differentiation and function of immune cells [37]. This could be one possible mechanism to support progression of the disease.

In human medicine, several studies demonstrated a difference in nasal bacterial communities when comparing healthy humans to patients with chronic rhinosinusitis (CRS). CRS patients were characterized by altered microbial composition and greater abundance of *S. aureus* [12]. A quantitative increase in most bacterial and fungal species was reported in patients with CRS relative to controls, but qualitatively similar microbiomes [24]. This study also performed a more detailed characterization of the immune response. Flow cytometry was performed to measure contents of immune cells in lavage of the middle meatus in CRS and control patients, and cytokines and chemokines were measured by multiplexed ELISA. Results of this investigations demonstrated significantly elevated  $T_H2$ -related cytokines and increased interleukin (IL) 8 in patients with CRS. Immune response of peripheral blood leukocytes of CRS patients cocultured with lavage of healthy individuals was analyzed measuring the IL-5 secretion (i.e.  $T_H2$  response) by ELISpot assay. Data supported the theory that in some cases, CRS results from an immune hyperresponsiveness to the commensal microbiome. No similar investigations have been performed in dogs with chronic rhinitis so far, but it would be interesting to investigate the immune response of dogs with chronic rhinitis.

For the development of neoplastic diseases, an involvement of microbiome alterations and dysbiosis has been discussed in different human studies as well [13, 38]. One study reported that the bacterial profiles of the larynx of laryngeal cancer patients were significantly different from those of healthy control subjects. It suggested a potential role of several microorganisms in the pathogenesis of laryngeal carcinoma, for example *Fusobacterium* spp. as

proinflammatory pathogens [13]. To what extent the altered bacterial taxa, like increased incidence of *Pasteurellaceae*, found in the dogs with nasal neoplasia in the present study could be involved in cancerogenesis, remains a topic for further research.

An interesting finding was that the nasal microbial composition of dogs with nasal tumors was not significantly altered if dogs had been pretreated with antibiotics. In a study investigating the gastrointestinal microbiota in dogs before and under antibiotic treatment, considerable and prolonged effects on bacterial composition could be demonstrated [39]. However, due to the relatively small number of diseased patients in the present study and the heterogeneous treatment protocols with different antimicrobial and partially anti-inflammatory drugs, validity of this finding is limited. Nevertheless, only a few taxa were altered significantly between pretreated and untreated patients, and the diversity and number of observed species was similar. Possible reasons could be insufficient accumulation of antibacterial drugs in the nasal mucosa, bacterial resistance to antibiotics, or detection of DNA from nonviable bacteria.

Limitations of the present study are the relatively small number of animals per group, and a heterogeneous pretreatment within the population of diseased animals. Furthermore, different settings of sample collection between healthy dogs being awake and diseased dogs being under anesthesia could be a confounding factor leading to different results.

### Conclusion

Using next-generation sequencing methods, a highly species-rich bacterial community was shown to inhabit the canine nasal cavity. The majority of bacteria detected in this study had never or only rarely been isolated before with conventional culture techniques. Significant differences in the composition of microbiota colonizing the nose of healthy dogs compared to dogs with nasal neoplasia or chronic rhinitis suggest a complex role of the nasal microbiome in the disease process. Further studies are warranted to elucidate the complex interactions between nasal microbiome, host immune response, and canine nasal disease.

### Supporting information

**S1 Table. Mean relative percentages of the bacterial groups differing between healthy and diseased dogs, at various phylogenetic levels (phylum, class, order, family, genus, species), based on sequencing of the 16S-rRNA-gene.**  
(XLSX)

### Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. Melanie Wergin for assistance with sample collection.

### Author Contributions

**Conceptualization:** BT BSS.

**Formal analysis:** TN PR.

**Investigation:** BT ESD KW.

**Project administration:** BSS.

**Resources:** JS KH.

**Supervision:** BSS.

**Writing – original draft:** BT BSS.

## References

1. Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS microbiology ecology*. 2011; 76(2):301–10. Epub 2011/01/26. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x> PMID: 21261668
2. Rodrigues Hoffmann A, Patterson AP, Diesel A, Lawhon SD, Ly HJ, Elkins Stephenson C, et al. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS one*. 2014; 9(1):e83197. Epub 2014/01/15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083197> PMID: 24421875
3. Dewhirst FE, Klein EA, Thompson EC, Blanton JM, Chen T, Milella L, et al. The canine oral microbiome. *PLoS one*. 2012; 7(4):e36067. Epub 2012/05/05. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036067> PMID: 22558330
4. Hutchins RG, Vaden SL, Jacob ME, Harris TL, Bowles KD, Wood MW, et al. Vaginal microbiota of spayed dogs with or without recurrent urinary tract infections. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2014; 28(2):300–4. Epub 2014/01/29.
5. Ericsson AC, Personett AR, Grobman ME, Rindt H, Reinero CR. Composition and Predicted Metabolic Capacity of Upper and Lower Airway Microbiota of Healthy Dogs in Relation to the Fecal Microbiota. *PLoS one*. 2016; 11(5):e0154646. Epub 2016/05/03. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154646> PMID: 27136381
6. Minamoto Y, Otoni CC, Steelman SM, Buyukleblebici O, Steiner JM, Jergens AE, et al. Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut microbes*. 2016; 6(1):33–47. Epub 2014/12/23. <https://doi.org/10.1080/19490976.2014.997612> PMID: 25531678
7. Suchodolski JS, Markel ME, Garcia-Mazcorro JF, Unterer S, Heilmann RM, Dowd SE, et al. The fecal microbiome in dogs with acute diarrhea and idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS one*. 2012; 7(12):e51907. Epub 2013/01/10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051907> PMID: 23300577
8. Windsor RC, Johnson LR. Canine chronic inflammatory rhinitis. Clinical techniques in small animal practice. 2006; 21(2):76–81. Epub 2006/05/23. <https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2005.12.014> PMID: 16711613
9. Cohn LA, Reinero CR. Respiratory defenses in health and disease. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice*. 2007; 37(5):845–60, v. Epub 2007/08/19. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.05.003> PMID: 17693202
10. Bassis CM, Tang AL, Young VB, Pynnonen MA. The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome*. 2014; 2:27. Epub 2014/08/22. <https://doi.org/10.1186/2049-2618-2-27> PMID: 25143824
11. Ramakrishnan VR, Feazel LM, Gitomer SA, Ir D, Robertson CE, Frank DN. The microbiome of the middle meatus in healthy adults. *PLoS one*. 2013; 8(12):e85507. Epub 2014/01/05. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085507> PMID: 24386477
12. Feazel LM, Robertson CE, Ramakrishnan VR, Frank DN. Microbiome complexity and *Staphylococcus aureus* in chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*. 2012; 122(2):467–72. Epub 2012/01/19. <https://doi.org/10.1002/lary.22398> PMID: 22253013
13. Gong H, Shi Y, Zhou X, Wu C, Cao P, Xu C, et al. Microbiota in the Throat and Risk Factors for Laryngeal Carcinoma. *Applied and environmental microbiology*. 2014; 80(23):7356–63. Epub 2014/09/23. <https://doi.org/10.1128/AEM.02329-14> PMID: 25239901
14. Abramson AL, Isenberg HD, McDermott LM. Microbiology of the canine nasal cavities. *Rhinology*. 1980; 18(3):143–50. Epub 1980/09/01. PMID: 6251533
15. Smith JE. The aerobic bacteria of the nose and tonsils of healthy dogs. *Journal of comparative pathology*. 1961; 71:428–33. Epub 1961/10/01. PMID: 13914276
16. Windsor RC, Johnson LR, Sykes JE, Drazenovich TL, Leutenegger CM, De Cock HE. Molecular detection of microbes in nasal tissue of dogs with idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2006; 20(2):250–6. Epub 2006/04/06.
17. Vingataramin L, Frost EH. A single protocol for extraction of gDNA from bacteria and yeast. *BioTechniques*. 2015; 58(3):120–5. Epub 2015/03/12. <https://doi.org/10.2144/000114263> PMID: 25757544
18. Isaiah A, Parambeth JC, Steiner JM, Lidbury JA, Suchodolski JS. The fecal microbiome of dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *Anaerobe*. 2017. Epub 2017/02/23.
19. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*. 2010; 7(5):335–6. Epub 2010/04/13. <https://doi.org/10.1038/nmeth.f.303> PMID: 20383131
20. Chao A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics*. 1984; 11:265–70.

21. Bell ET, Suchodolski JS, Isaiah A, Fleeman LM, Cook AK, Steiner JM, et al. Faecal microbiota of cats with insulin-treated diabetes mellitus. *PLoS one*. 2014; 9(10):e108729. Epub 2014/10/04. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108729> PMID: 25279695
22. Slifker MJ, Friendship RM, Weese JS. Longitudinal study of the early-life fecal and nasal microbiotas of the domestic pig. *BMC microbiology*. 2015; 15(1):184. Epub 2015/09/24. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0512-7> PMID: 26391877
23. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B* 1995; 57:289–300.
24. Aurora R, Chatterjee D, Hentzleman J, Prasad G, Sindwani R, Sanford T. Contrasting the microbiomes from healthy volunteers and patients with chronic rhinosinusitis. *JAMA otolaryngology—head & neck surgery*. 2013; 139(12):1328–38. Epub 2013/11/02.
25. Camanocha A, Dewhirst FE. Host-associated bacterial taxa from *Chlorobi*, *Chloroflexi*, GN02, *Synergistetes*, SR1, TM7, and WPS-2 Phyla/candidate divisions. *Journal of oral microbiology*. 2014; 6. Epub 2014/10/16.
26. Coi DA, Alexiev A, Wallis C, O'Flynn C, Deusch O, Davis I, et al. Draft genome sequences of 26 porphyromonas strains isolated from the canine oral microbiome. *Genome announcements*. 2015; 3(2). Epub 2015/04/11.
27. Gallego V, Garcia MT, Ventosa A. *Methylobacterium adhaesivum* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from drinking water. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*. 2006; 56(Pt 2):339–42. Epub 2006/02/02. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63966-0> PMID: 16449436
28. Sarris PF, Trantas EA, Mpalandinaki E, Ververidis F, Goumas DE. *Pseudomonas viridiflava*, a multi host plant pathogen with significant genetic variation at the molecular level. *PLoS one*. 2012; 7(4):e36090. Epub 2012/05/05. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036090> PMID: 22558343
29. Balish E, Cleven D, Brown J, Yale CE. Nose, throat, and fecal flora of beagle dogs housed in "locked" or "open" environments. *Applied and environmental microbiology*. 1977; 34(2):207–21. Epub 1977/08/01. PMID: 907342
30. Abramson AL, D'Amato RF, Isenberg HD, Pryor WH. Microbiology of the canine nasal cavities. The Annals of otology, rhinology, and laryngology. 1976; 85(3 pt 1):394–7. Epub 1976/05/01. <https://doi.org/10.1177/000348947608500312> PMID: 937967
31. Lemon KP, Klepac-Ceraj V, Schiffer HK, Brodie EL, Lynch SV, Kolter R. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. *mBio*. 2010; 1(3). Epub 2010/08/31.
32. Schulz B, Hähner M, Werckenthin C, Hartmann K, editors. Bacterial species in the respiratory tract of dogs with respiratory disease—800 cases. 24th symposium of the veterinary comparative respiratory society; 2006 8.-10.10.2006; Jena.
33. Lobetti RG. A retrospective study of chronic nasal disease in 75 dogs. *Journal of the South African Veterinary Association*. 2009; 80(4):224–8. Epub 2010/05/13. PMID: 20458862
34. Lima SF, Teixeira AG, Higgins CH, Lima FS, Bicalho RC. The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. *Scientific reports*. 2016; 6:29050. Epub 2016/07/02. <https://doi.org/10.1038/srep29050> PMID: 27363739
35. Le Boedec K. A systematic review and meta-analysis of the association between *Mycoplasma* spp and upper and lower respiratory tract disease in cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2017; 250(4):397–407. Epub 2017/02/07. <https://doi.org/10.2460/javma.250.4.397> PMID: 28165317
36. Pappalardo BL, Brown T, Gookin JL, Morrill CL, Breitschwerdt EB. Granulomatous disease associated with *Bartonella* infection in 2 dogs. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*. 2000; 14(1):37–42. Epub 2000/02/11.
37. Kubatzky KF, Kloos B, Hildebrand D. Signaling cascades of *Pasteurella multocida* toxin in immune evasion. *Toxins*. 2013; 5(9):1664–81. Epub 2013/09/26. <https://doi.org/10.3390/toxins5091664> PMID: 24064721
38. Borges-Canha M, Portela-Cidade JP, Dinis-Ribeiro M, Leite-Moreira AF, Pimentel-Nunes P. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: A systematic review. *Revista espanola de enfermedades digestivas: organo oficial de la Sociedad Espanola de Patologia Digestiva*. 2015; 107(11). Epub 2015/11/07.
39. Suchodolski JS, Dowd SE, Westermarck E, Steiner JM, Wolcott RD, Spillmann T, et al. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC microbiology*. 2009; 9:210. Epub 2009/10/06. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-210> PMID: 19799792

[illegible]

k_Bacteria p_Proteobacteria c_Alpha proteobacteria o_Rhizobiales f_Rhizobiaceae g_	0.01	0.07	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.035	0.598
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Alpha proteobacteria o_Rhodobacteriales f_Rhodobacteriaceae Other	0.05	0.07	0.08	0.01 <sup>a</sup>	0.00	0.008	0.388
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Alpha proteobacteria o_Sphingomonadales f_Sphingomonadaceae g_	0.32	0.03 <sup>a</sup>	0.03	0.29 <sup>a</sup>	0.42	0.036	0.598
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Alpha proteobacteria o_Sphingomonadales f_Sphingomonadaceae g_Sphingobium	0.01	0.07	0.00	0.01 <sup>a</sup>	0.00	0.052	0.598
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Betaproteobacteria Other Other	0.00	0.07	0.01	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.014	0.575
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Betaproteobacteria o_Burkholderiales f_Alcaligenaceae Other	0.01	0.10	0.26	0.01 <sup>a</sup>	0.01	0.004	0.249
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Nitrosomonadales f_Nitrosomonadaceae g_	0.00	0.07	0.00	0.03 <sup>a</sup>	0.07	0.053	0.598
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Nitrosomonadales f_Nitrosomonadaceae g_Nitrospiro	0.01	0.08	0.07	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.002	0.197
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Aeromonadales f_Aeromonadaceae g_	3.53	0.03	0.10	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.026	0.598
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Cardiobacteriales f_Cardiobacteriaceae Other	2.55	0.07	0.10	0.10 <sup>a</sup>	2.49	0.026	0.598
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Pasteurellales f_Pasteurellaceae g_Pasteurella	0.08	0.04 <sup>a</sup>	0.05	0.13 <sup>a</sup>	0.11	0.002	0.197
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Pseudomonadales f_Moraxellaceae g_Moraxella	30.33	15.34 <sup>a</sup>	21.90	34.53 <sup>a</sup>	31.32	0.001	0.197
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Pseudomonadales f_Moraxellaceae g_Pseudomonas	0.04	0.07 <sup>a</sup>	0.01	0.06 <sup>a</sup>	0.10	0.016	0.575
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Xanthomonadales f_Xanthomonadaceae g_Luteimonas	0.01	0.07 <sup>a</sup>	0.05	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.033	0.598
<b>Species</b>							
k_Archaea p_Crenarchaeota c_Thaumarchaeota o_Nitrososphaerales f_Nitrososphaeraceae g_Candidatus							
Nitrososphaera s_SCA1170	0.14	0.07 <sup>a</sup>	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.005	0.209
k_Bacteria p_Acidobacteria c_Acidobacteria o_COU211 f_	0.04	0.07 <sup>a</sup>	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.049	0.511
k_Bacteria p_Acidobacteria c_Acidobacteria o_III-151 f_	0.20	0.07 <sup>a</sup>	0.01	0.18 <sup>a</sup>	0.40	0.031	0.494
k_Bacteria p_Acidobacteria c_Chloracidobacteria o_RB41 f_Elin6075 g_	0.60	0.04 <sup>a</sup>	0.10	0.35 <sup>a</sup>	0.65	0.024	0.485
k_Bacteria p_Actinobacteria c_Actinobacteria o_Actinomyetales f_ACK-M11 g_	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.025	0.485
k_Bacteria p_Actinobacteria c_Actinobacteria o_Micrococcales f_Micrococaceae g_Arthrobacter Other	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.07 <sup>a</sup>	0.16	0.023	0.485
k_Bacteria p_Bacteroidetes c_Sphingobacteriales f_Sphingobacteriaceae g_Fedobacter s_	0.48	0.02 <sup>a</sup>	0.04	0.04 <sup>a</sup>	0.02	0.026	0.485
k_Bacteria p_Bacteroidetes c_Phycisphaerae o_WD2101 f_	0.19	0.00	0.01	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.003	0.209
k_Bacteria p_Bacteroidetes c_Planctomycetes o_Gemmatimonadales f_Gemmatimonadaceae g_Gemmatimonas	0.21	0.00	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.08	0.032	0.485
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Alphaproteobacteria o_Rhodobiales f_Rhodospirillaceae g_Rhodospirillum	0.29	0.07 <sup>a</sup>	0.01	0.02 <sup>a</sup>	0.01	0.042	0.511
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Alphaproteobacteria o_Rhodobiales f_Rhodospirillaceae g_Devosia s_	0.01	0.07 <sup>a</sup>	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.035	0.494
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Rhodobacteriales f_Rhodobacteriaceae Other Other	0.05	0.02 <sup>a</sup>	0.08	0.01 <sup>a</sup>	0.01	0.008	0.297
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Alphaproteobacteria o_Sphingomonadales f_Sphingomonadaceae g_Kaisobacter s_	0.32	0.03 <sup>a</sup>	0.03	0.29 <sup>a</sup>	0.42	0.036	0.494
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Alphaproteobacteria o_Sphingomonadales f_Sphingomonadaceae g_Sphingobium s_	0.10	0.07 <sup>a</sup>	0.00	0.01 <sup>a</sup>	0.01	0.052	0.511
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Betaproteobacteria Other Other Other	0.00	0.07 <sup>a</sup>	0.01	0.00 <sup>a</sup>	0.02	0.005	0.209
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Betaproteobacteria Other Other Other	0.00	0.07 <sup>a</sup>	0.01	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.014	0.475
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Betaproteobacteria o_Burkholderiales f_Alcaligenaceae Other Other	0.01	0.17 <sup>a</sup>	0.26	0.01 <sup>a</sup>	0.01	0.004	0.209
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Betaproteobacteria o_Nitrosomonadales f_	0.00	0.04 <sup>a</sup>	0.12	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.002	0.209
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Nitrosomonadales f_Nitrosomonadaceae g_Nitrospiro s_tenuis	0.00	0.07 <sup>a</sup>	0.00	0.03 <sup>a</sup>	0.07	0.053	0.511
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Aeromonadales f_Aeromonadaceae g_	0.01	0.03 <sup>a</sup>	0.07	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.002	0.188
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Cardiobacteriales f_Cardiobacteriaceae Other Other	3.55	0.18 <sup>a</sup>	0.10	1.15 <sup>a</sup>	2.49	0.026	0.485
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Pasteurellales f_Pasteurellaceae g_Aggregatibacter s_septis	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.024	0.485
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Pasteurellales f_Pasteurellaceae g_Haemophilus s_praefluens	0.00	0.06 <sup>a</sup>	0.17	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.018	0.481
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Pasteurellales f_Pasteurellaceae g_Pasteurella Other	0.00	0.01	0.01	0.00 <sup>a</sup>	0.01	0.035	0.494
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Pasteurellales f_Pasteurellaceae g_Pasteurella Other	0.08	0.35 <sup>a</sup>	6.49	0.31 <sup>a</sup>	0.07	0.004	0.209
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Pseudomonadales f_Moraxellaceae g_Moraxella s_	30.18	14.95 <sup>a</sup>	21.53	33.83 <sup>a</sup>	31.49	0.001	0.188
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Pseudomonadales f_Moraxellaceae g_Pseudomonas Other	0.01	0.07 <sup>a</sup>	0.00	0.00 <sup>a</sup>	0.01	0.018	0.481
k_Bacteria p_Proteobacteria c_Gammaproteobacteria o_Xanthomonadales f_Xanthomonadaceae g_Luteimonas s_	0.01	0.07 <sup>a</sup>	0.05	0.00 <sup>a</sup>	0.00	0.033	0.494

<sup>a</sup>Means not sharing a common superscript differ significantly ( $p < 0.05$ , Dunn's multiple comparison test)

S1 Table. Mean relative percentages of the bacterial groups differing between healthy and diseased dogs, at various phylogenetic levels (phylum, class, order, family, genus, species), based on sequencing of the 16S-rRNA gene.



## IV. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde das Mikrobiom der Nasenhöhle von gesunden Hunden sowie Hunden mit nasalen Neoplasien und chronischer Rhinitis untersucht. Mithilfe der durchgeführten Analysen konnte eine spezie-reiche mikrobielle Gemeinschaft in der caninen Nasenhöhle nachgewiesen werden. Wie bereits in vorangegangenen Studien, die 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzanalyse-Verfahren zur Untersuchung dieser Lokalisation nutzten, wurde das nasale Mikrobiom des Hundes von Bakterien der Familie *Moraxellaceae* dominiert, insbesondere von *Moraxella* spp. (RODRIGUES HOFFMANN et al., 2014; ERICSSON et al., 2016). Der prozentuale Anteil anderer Bakterienfamilien variiert, qualitativ zeigte sich jedoch große Übereinstimmung zwischen den unterschiedlichen Studienpopulationen. Während in der Population, die in einer vorangegangenen Studie von ERICSSON und Mitarbeitern (2016) untersucht wurde, *Mycoplasmataceae* (Phylum Tenericutes) einen großen prozentualen Anteil an der Bakteriengemeinschaft der Hunde hatten, wurde diese bakterielle Familie in der hier untersuchten Gruppe von Hunden zwar ebenfalls bei den meisten Tieren nachgewiesen, jedoch nur in sehr geringer Menge. Ein möglicher Grund für diese Unterschiede könnte die Auswahl der Tiere sein. Während ERICSSON und Mitarbeiter (2016) die Proben von einer einheitlichen Versuchstiergruppe sammelten, die derselben Rasse angehörte sowie unter identischen Umweltbedingungen gehalten wurde, wurden in der vorliegenden Studie sowie in der Arbeit von RODRIGUES HOFFMANN und Mitarbeitern (2014) eine heterogene Gruppe von Tieren untersucht, die in unterschiedlicher Umgebung als private Haustiere gehalten wurden. Der Einfluss, den Umweltfaktoren wie die Haltungsumgebung auf das nasale Mikrobiom haben, wurde in einer Studie von ISIAH und Mitarbeitern (2017) untersucht. Diese stellten fest, dass das nasale Mikrobiom von zwei Hundepopulationen verschiedener US-Bundesstaaten, die derselben Rasse angehörten, ein signifikantes Clustering, abhängig von der geographischen Lokalisation, zeigte. Die Gründe dafür sind bisher nicht bekannt.

Auch die Vielfalt an Hunderassen und die damit einhergehenden, teilweise gravierenden morphologischen Unterschiede im Hinblick auf die Anatomie der oberen Atemwege ist ein möglicher Faktor, der zu unterschiedlichen Ergebnissen führen kann. In der vorliegenden Studie wurden nur normozephele, d.h. meso-

und dolichocephale Hunde einbezogen. Da die Untersuchung des Nasenmikrobioms gesunder Hunde Ziel der Studie war, wurden brachycephale Tiere mit Anzeichen eines Brachycephalen Atemnot-Syndroms nicht beprobt. Erste Ergebnisse einer Studie von RÖSCH und Mitarbeitern (2017), die gezielt das Mikrobiom normo- und brachycephaler Hunde vergleicht, weisen auf Unterschiede bei der bakteriellen Besiedelung der Nasenhöhle dieser beiden Gruppen hin. So waren *Moraxellaceae*, *Pasteurellaceae* und *Rhizobiaceae* die am häufigsten vertretenen Bakterienfamilien im gesamten Patientenkollektiv. *Moraxellaceae* sind auch in der vorliegenden Untersuchung die am häufigsten vertretene Bakterienfamilie bei gesunden wie auch erkrankten Hunden. *Pasteurellaceae* dagegen kamen bei gesunden Tieren nur in geringer Häufigkeit vor. *Bradyrhizobiaceae* wurden als potentielle Kontaminanten in der vorliegenden Arbeit von der Analyse ausgeschlossen. Unterschiede zwischen normozephalen und brachycephalen Hunden wurden in der Häufigkeit der Familien *Aeromonadaceae*, *Microbacteriaceae* und *Rhizobiaceae* festgestellt. Als Ursache wird die Minderbelüftung durch die Brachycephalie-bedingte nasale Obstruktion vermutet (RÖSCH et al., 2017).

Zahlreiche der nachgewiesenen bakteriellen Taxa wurden erst mit Einführung der Next-Generation-Sequencing-Methoden (NGS-Methoden) erstmals beschrieben. Die Anforderungen an die Mikroumgebung, die diese Taxa stellen, sind unter Laborbedingungen kaum reproduzierbar, wodurch sie bisherigen kulturellen Untersuchungen entgingen (AURORA et al., 2013). Diese Bakterien wurden bisher nicht mit dem Mikrobiom der caninen Nasenhöhle assoziiert. Einige Taxa sind jedoch als Teil des Mikrobioms beim Hund bekannt, da sie bereits an anderen Körperstellen nachgewiesen wurden. So wurden *Porphyromonas*, GN02 und *Conchiformibius* in Studien zum Mikrobiom der Maulhöhle des Hundes nachgewiesen (CAMANOCHA & DEWHIRST, 2014; COIL et al., 2015). Für das Phylum BD1-5, das mit 1,9% bei gesunden Tieren ebenfalls zu den häufig nachgewiesenen OTUs in dieser Studienpopulation gehörte, ist bekannt, dass es aufgrund seines kleinen Genoms von Nährstoffen der anderen Mitglieder der bakteriellen Gemeinschaft abhängt. Aus diesem Grund ist es bislang nicht gelungen, dieses Phylum kulturell zu isolieren (GARZA & DUTILH, 2015).

Andere Taxa, wie *Methylobacterium adhaesivum* und *Pseudomonas viridiflava* sind als Umweltbakterien bekannt, die in Wasser- und Bodenproben gefunden wurden (GALLEGO et al., 2006; SARRIS et al., 2012). Auch *Rhizobiaceae* und

*Bradyrhizobium* spp. sind bekannte Bakterien aus Probenmaterial des Erdreichs (ZARRAONAINDIA et al., 2015). Der Nachweis dieser Bakterien im Nasenmikrobiom des Hundes lässt vermuten, dass sie mit der Atemluft in die oberen Atemwege gelangen und auf diesem Wege die ökologische Nische Nasenhöhle besiedeln. Cyanobakterien etwa, die in einer humanmedizinischen Studie als Hauptbestandteil des Nasenhöhlenmikrobioms von gesunden Erwachsenen und Patienten mit CRS identifiziert wurden (AURORA et al., 2013), wurden in einer veterinärmedizinischen Studie von der Analyse ausgeschlossen, da davon ausgegangen wurde, dass es sich um Kontaminanten aus pflanzlichen Chloroplasten handelte (ISAIAH et al., 2017). Tatsächlich ist diese Bakterienstamm aus Meer- und Süßwasserproben sowie aus Bodenproben bekannt und gilt als phototroph (WHITTON, 1992), was ein dauerhaftes Vorkommen unter den gegebenen Bedingungen in der Nasenhöhle unwahrscheinlich wirken lässt. Einige Vertreter dieses Phylums sind als Allergieauslöser bekannt (GENITSARIS et al., 2011). Hinweise auf einen Einfluss der Umgebung auf das tierische Nasenmikrobiom lieferte vor Kurzem unter anderem eine Studie von DORN und Mitarbeitern (2017), in der gezeigt wurde, dass Katzen, die Freigang haben, eine signifikant geringere Diversität und eine signifikant andere Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms aufweisen, als Katzen, die ausschließlich in Innenräumen gehalten werden. So waren die Gattungen *Moraxella* weniger, *Bradyrhizobium*, *Pasteurella* und *Staphylococcus* jedoch stärker mit Innenhaltung der Katzen assoziiert.

Die Anzahl nachgewiesener bakterieller Taxa in Studien, die NGS-Methoden nutzen, ist wesentlich höher als in vorangegangenen Arbeiten, die sich der konventionellen kulturellen Anzucht von Bakterien bedienen. Als Hauptbestandteile der bakteriellen Gemeinschaft in der Nase von Hunden wurden klassischerweise die kulturell nachgewiesenen Bakterien wie Staphylokokken, Streptokokken, *Acinetobacter* und Enterokokken angesehen (ABRAMSON et al., 1976; BALISH et al., 1977; ABRAMSON et al., 1980). Taxa, die mittels Sequenzanalyse als größter Anteil des caninen Nasenmikrobioms identifiziert wurden (RODRIGUES HOFFMANN et al., 2014; ERICSSON et al., 2016), und auch in der vorliegenden Untersuchung dominierend waren, wie etwa die Gruppe der *Moraxellaceae*, waren in kultur-basierten Untersuchungen nicht nachweisbar.

Zum nasalen Mikrobiom sowohl des gesunden Menschen als auch des Patienten mit nasalen Erkrankungen existieren zahlreiche Studien, die auf der

Sequenzanalyse des 16S rRNA-Gens basieren. In verschiedenen anatomischen Lokalisationen der oberen Atemwege wurden jeweils unterschiedliche charakteristische Mikrobiome nachgewiesen (LEMON et al., 2010; BASSIS et al., 2014). Beim Menschen wurden Actinobacter und Firmicutes als Hauptbestandteil der nasalen mikrobiellen Gemeinschaft identifiziert (FRANK et al., 2010), Proteobacteria kommen, verglichen mit den Ergebnissen von Studien an anderen Säugetierspezies wie Hund (RODRIGUES HOFFMANN et al., 2014), Schwein (WEESE et al., 2014) und Katze (DORN et al., 2017), im humanen Nasenmikrobiom in deutlich geringerer Prävalenz vor. Im Speziesvergleich zeigen sich somit deutliche Unterschiede im Mikrobiom der oberen Atemwege.

In der Veterinärmedizin existieren bisher nur wenige Untersuchungen zur mikrobiellen Besiedelung der oberen Atemwege bei Hunden mit nasalen Erkrankungen. In der vorliegenden Studie kommt erstmals die Methode der 16S-rRNA-Sequenzierung zum Einsatz, um das nasale Mikrobiom von Hunden mit Erkrankungen der Nasenhöhle zu analysieren. Bakterien aus den oberen Atemwegen von Hunden, die respiratorische Symptome zeigen, wurden zuvor mit kultur-basierten Methoden untersucht (SCHULZ et al., 2006). Die Bakterien, die hier am häufigsten isoliert wurden, wie etwa *Staphylococcus intermedius*, *Escherichia coli*,  $\alpha$ -hämolyisierende Streptokokken und *Pasteurella multocida*, gehören nicht zu den als primär pathogen bekannten Spezies, sondern entstammen vermutlich der physiologischen nasalen Besiedelung. Mit Ausnahme von *E. coli* wurden diese Bakterien auch in der hier untersuchten Studienpopulation nachgewiesen, allerdings stellten sie bei gesunden wie bei erkrankten Tieren nur einen kleinen Anteil an der gesamten bakteriellen Population dar. Während verschiedene Spezies aus den Gattungen *Staphylococcus* und *Pasteurella* in geringer Anzahl bei den meisten Tieren nachweisbar waren, wurde die Gattung *Streptococcus* nur bei einzelnen Tieren gefunden.

Mit der Anzüchtung von Bakterien aus der Nasenhöhle von Hunden, die an nasalen Neoplasien oder LPR erkrankt waren, beschäftigte sich eine Studie von LOBETTI (2009). Dabei wurden in beiden Krankheitsgruppen zu jeweils gleichen Anteilen negative Kulturergebnisse sowie der Nachweis von Bakterien, die zur normalen Bakteriengemeinschaft der Nase gehören, beschrieben. Die Definition der „normalen“ nasalen Besiedelung war dabei der Literatur entnommen. Negative Kulturen führten zu der Annahme, dass die oberen Atemwege bei den betreffenden Tieren als steril anzusehen sind. Dies konnte durch Verwendung von

Sequenzierungsmethoden widerlegt werden.

WINDSOR und Mitarbeiter (2006) nutzen Biopate der Nasenschleimhaut von Hunden mit LPR, nasalen Neoplasien und Aspergillose, um diese mittels PCR auf bakterielle und fungale DNA zu untersuchen. Die Menge an DNA unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Des Weiteren wurden in keiner der Biopsieproben Bakterien nachgewiesen, die bei verschiedenen Tierspezies mit Infektionen des oberen Respirationstrakts assoziiert sind, wie *Bartonella* spp. (PAPPALARDO et al., 2000), *Mycoplasma* spp. (LIMA et al., 2016; LE BOEDEC, 2017) oder *Chlamydia* spp. (LIMA et al., 2016). Auch in der hier vorliegenden Studie konnten potentiell fakultative Pathogene des Respirationstrakts wie *Mycoplasma* spp. nur in sehr geringer Anzahl nachgewiesen werden, mit Ausnahme eines einzelnen Jungtieres mit chronischer Rhinitis, bei dem 67% der bakteriellen DNA-Sequenzen der Familie *Mycoplasmataceae* zugeordnet werden konnten. Allerdings wurde die bakterielle DNA hier nicht aus Biopaten der Nasenschleimhaut, sondern ausschließlich aus Tupferproben der Nasenhöhle extrahiert. Denkbar ist jedoch, dass die Bakterien, die das eigentliche Mikrobiom der Nasenschleimhaut darstellen, entweder intrazellulär in der Mukosa (KIM et al., 2013; TAN et al., 2013) oder direkt auf der Mukosa in Form von bakteriellen Biofilmen zu finden sind (FOREMAN et al., 2012). In diesem Fall wäre die bakterielle Diversität mit einer Tupferprobe nicht zu erfassen. Die Frage, ob die Auswahl des Probenmaterials Einfluss auf die isolierten bakteriellen Sequenzen hat, wurde unter anderem von BASSIOUNI und Mitarbeitern (2015) erörtert. So wurden die Sequenzierungsergebnisse von Nasenschleimhaut-Biopsien von CRS-Patienten mit denen von Nasenabstrichen verglichen, wobei weder bei der Alpha- noch bei der Beta-Diversität signifikante Unterschiede festzustellen waren. Daher ist davon auszugehen, dass die im Vergleich zu Biopsien deutlich weniger invasiven Tupferproben der Nasenschleimhaut die nasalen Mikrobiota hinreichend repräsentieren.

Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchung zeigten Unterschiede im nasalen Mikrobiom von gesunden Hunden und Hunden mit nasalen Tumoren und chronischer Rhinitis. So war insbesondere der Anteil der Familie *Moraxellaceae* bei erkrankten Hunden signifikant niedriger, während *Pasteurellaceae* in diesen Gruppen einen wesentlich größeren Anteil an den nasalen Mikrobiota ausmachten. Des Weiteren war die Familie der *Neisseriaceae* in der Gruppe der Hunde mit Neoplasien stärker vertreten. Dieser Unterschied war statistisch jedoch

nicht signifikant. Inwieweit diese Veränderungen im Mikrobiom jedoch in ätiologischem Zusammenhang mit der Erkrankung stehen oder eine Folge des primären Krankheitsprozesses darstellen, bedarf weiterführender Untersuchungen. Ein denkbarer Mechanismus, der zur Überwucherung mit einzelnen bakteriellen Taxa führen könnte, ist eine lokale Modulation der Immunabwehr im Bereich der Nasenschleimhaut, ausgelöst durch die zugrundeliegende Erkrankung. Auch Bakterien selbst können das Immunsystem ihres Wirtsorganismus beeinflussen. Für einige Bakterien, die unter anderem in dieser Studienpopulation nachgewiesen wurden, sind derartige immunmodulierende Mechanismen bekannt. So ist etwa bei toxischen Stämmen von *Pasteurella multocida* das Proteintoxin PMT beschrieben, das als ursächlich für die Rhinitis atrophicans des Schweines gilt (AMIGOT et al., 1998). Dieses Toxin hat eine ausgeprägte mitogene Wirkung, verhindert die Apoptose infizierter Zellen und beeinflusst die Differenzierung und Funktion von Immunzellen (KUBATZKY et al., 2013). Ähnliche Auswirkungen sind prinzipiell auch für die in der Gruppe der Hunde mit nasalen Neoplasien überrepräsentierten *Pasteurellaceae* möglich.

Die Rolle des Mikrobioms und Veränderungen desselben im Sinne einer Dysbiose bei der Entstehung von Tumoren wurden im Bereich der Nasenhöhle Tumoren des Hundes bisher nicht untersucht. Allerdings sind ähnliche Zusammenhänge, wie sie etwa beim humanen primären MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) - Lymphom des Magens, bei dem die kontinuierliche Entzündung im Rahmen einer *Helicobacter pylori*-Infektion (HANDA et al., 2010) die Entstehung des Lymphoms bedingt, oder beim kolorektalen Karzinom (BORGES-CANHA et al., 2015) des Menschen beschrieben sind, nicht ausgeschlossen. Auch bei Humanpatienten mit Larynxkarzinom wurden in einer Studie von GONG und Mitarbeitern (2014) signifikant unterschiedliche Bakterienprofile im Vergleich zu einer gesunden Kontrollpopulation nachgewiesen. Eine potentielle Beteiligung verschiedener Mikroorganismen an der Pathogenese des laryngealen Karzinoms wurde angenommen, wie etwa durch *Fusobacterium* spp., die als proinflammatorische Pathogene gelten (GONG et al., 2014). Zum nasalen Mikrobiom von humanen Patienten mit Tumoren der Nasenhöhle liegen keine Studien vor. Dies ist möglicherweise der geringen Inzidenz derartiger Neoplasien beim Menschen geschuldet (ROBBINS et al., 2011).

Eine weitaus größere Rolle spielen in der Humanmedizin entzündliche Erkrankungen der oberen Atemwege, insbesondere die chronische Rhinosinusitis

(CRS), die bis zu 5% der Bevölkerung der westlichen Gesellschaft betrifft (FOKKENS et al., 2012). Zahlreiche Studien belegen, dass diese Erkrankung mit einem veränderten nasalen Mikrobiom einhergeht. So zeigten FEAZEL und Mitarbeiter (2012), dass etwa *Staphylococcus aureus* bei betroffenen Patienten signifikant häufiger auftritt. Andere Autoren dagegen stellten keine qualitativen Unterschiede im Mikrobiom erkrankter und gesunder Personen fest, beobachteten aber eine höhere Quantität der meisten Bakterien- und Pilzspezies bei CRS-Patienten (AURORA et al., 2013). Eine Quantifizierung aller identifizierten bakteriellen Taxa mittels qPCR wurde in der hier vorliegenden Studie nicht durchgeführt, weshalb keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob diese Beobachtung auch auf Hunde mit chronischer Rhinitis zutrifft. AURORA und Mitarbeiter (2013) führten weiterhin detaillierte Untersuchungen zur Immunantwort der Patienten auf das Mikrobiom durch, deren Ergebnisse die Theorie stützen, dass CRS in einigen Fällen durch eine überschießende Immunantwort auf kommensale Mikroorganismen ausgelöst wird. Bei Hunden mit chronischer Rhinitis wurden bisher keine derartigen Studien durchgeführt, wobei die Untersuchung der Immunantwort einer größeren Gruppe betroffener Hunde ebenfalls einen interessanten Forschungsansatz darstellen würde.

Eine Limitation der vorliegenden Studie ist die sehr variable Vorbehandlung innerhalb der Gruppe der erkrankten Tiere. Ein interessanter Aspekt hierbei ist allerdings, dass die mikrobielle Gemeinschaft in der Nasenhöhle bei Hunden, die innerhalb der letzten 14 Tage Antibiotika erhielten, keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zu Hunden ohne antibiotische Vorbehandlung aufwies. In vorangegangenen Arbeiten, die den Einfluss von Antibiotika auf die gastrointestinalen Mikrobiota beim Hund zum Thema hatten, wurden dagegen deutliche, langanhaltende Effekte auf das Mikrobiom des Jejunums (SUCHODOLSKI et al., 2009), sowie eine Verschiebung des fäkalen Mikrobioms hin zu Gram-negativen Bakterien (GRONVOLD et al., 2010) festgestellt. Zwar waren auch bei den hier untersuchten Tieren einzelne bakterielle Taxa, wie die Genera *Planctomyces* oder *Sphingobium*, stärker mit antibiotischer Vorbehandlung assoziiert, während etwa *Gemella* spp. vermehrt bei nicht vorbehandelten Tieren gefunden wurden. Hinsichtlich der Diversität und der Anzahl der nachgewiesenen Spezies ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede. Mögliche Ursachen hierfür wären einerseits eine mangelnde Anreicherung und damit Wirksamkeit der Antibiotika im Bereich der Nasenschleimhaut, die Resistenz der Bakterien gegen die verwendeten

Wirkstoffe, oder andererseits der Nachweis von bakterieller DNA, die von bereits abgetöteten Bakterien stammt. Aufgrund der relativ kleinen Population und der sehr heterogenen Vorbehandlung mit verschiedenen antimikrobiellen, sowie teilweise zusätzlich antiinflammatorischen Wirkstoffen, ist die Aussagekraft dieser Beobachtung allerdings eingeschränkt.

Des Weiteren ist die unterschiedliche Entnahmemethode der Nasentupferproben, die bei gesunden Tieren im Wachzustand, bei erkrankten Tieren jedoch unter Narkose erfolgte, als möglicher Einflussfaktor auf die nachgewiesenen Bakterien zu diskutieren. Während beim narkotisierten Tier ein tieferes Einführen und Rotieren des Tupfers in der Nasenhöhle möglich ist, erschweren Abwehrbewegungen beim wachen Tier die Probenentnahme. Eine Kontamination aus dem Bereich des Nasenspiegels und des Nasenvorhofs lässt sich hier nicht sicher vermeiden. Die Arbeit von DORN und Mitarbeitern (2017) verglich unter anderem bei einer kleinen Tiergruppe, ob sich Alpha- und Beta-Diversität unterscheiden, je nachdem, ob die Tupferproben aus der Nasenhöhle gesunder Katzen unter Narkose oder beim wachen Tier genommen wurden. Hierbei wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Ältere Studien, die sich kulturbasierter Verfahren bedienten, legten bereits nahe, dass sich die mikrobielle Besiedelung in verschiedenen anatomischen Bereichen der caninen Nasenhöhle unterscheidet (ABRAMSON et al., 1976; ABRAMSON et al., 1980). Beim Menschen ist ebenfalls bekannt, dass sich die Bakteriengemeinschaft, die die Nares, den *Meatus nasi medius* sowie den sphenoethmoidalen Recessus besiedelt, unterschiedlich zusammensetzt, abhängig vom Epithel, das den entsprechenden Bereich auskleidet (YAN et al., 2013). Für den Bereich der Nasenschleimhaut ist eine größere Diversität beschrieben als im Bereich des Nasenvorhofs (YAN et al., 2013). Eine Differenzierung verschiedener anatomischer Lokalisationen war im gewählten Probennahme-Prozedere dieser Studie nicht möglich. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Alpha-Diversität, insbesondere hinsichtlich der Anzahl nachgewiesener Taxa, zwischen den wach oder narkotisiert beprobten Gruppen festgestellt.

Neben der Entnahme der Proben wird in der Literatur auch die präanalytische Lagerung der Proben als Parameter genannt, der zur Beeinflussung der Ergebnisse von Mikrobiomstudien führen kann (ROESCH et al., 2009; LAUBER et al., 2010; CARDONA et al., 2012; CARROLL et al., 2012). In der vorliegenden Arbeit wurden die Tupferproben überwiegend innerhalb weniger Minuten nach



Entnahme bis zur DNA-Extraktion bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. War dies nicht sofort möglich, wurden die Tupfer vor dem Einfrieren gekühlt maximal zwei Stunden transportiert. Bei Stuhlproben konnte gezeigt werden, dass die Lagerung bei Raumtemperatur über den Zeitraum von 24 und 72 Stunden zu einer zunehmenden Veränderung der mikrobiellen Zusammensetzung führt (ROESCH et al., 2009). Bei Raumtemperatur kommt es zur Fragmentierung der DNA und RNA, beim Auftauen tiefgekühlter Proben tritt zusätzlich eine Degeneration von DNA und RNA auf. Dies verfälscht die Ergebnisse der nachfolgenden Sequenzierung (CARDONA et al., 2012). Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie von CARROLL und Mitarbeitern (2012) die individuelle mikrobielle Zusammensetzung von Stuhlproben durch Lagerung bei Raumtemperatur über 24 Stunden und über das Einfrieren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  nur wenig beeinflusst. Auch LAUBER und Mitarbeiter (2010) postulieren, dass Umweltfaktoren und der Bias der molekularen Sequenzierung einen größeren Einfluss auf die nachweisbaren Mikroorganismen in Tupferproben aus Erde, menschlichem Stuhl und Hautabstrichen haben als kurzfristige Lagerungsbedingungen über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen.

Zusätzlich zu den Tupferproben der Studienpatienten wurden Negativkontrollen analysiert, um auszuschließen, dass die nachgewiesene bakterielle DNA aus Kontaminationen von Tupfern oder DNA-Extraktionskits stammt. Der Umgang mit den Ergebnissen dieser Negativkontrollen stellt insbesondere bei Mikrobiomstudien, deren Proben eine geringe mikrobielle Biomasse erwarten lassen, eine Herausforderung dar (KIM et al., 2017). Auch Tupferproben der oberen Atemwege gehören im Vergleich zu anderen Untersuchungsmaterialien, wie etwa Faeces, zu den Proben mit geringem DNA-Gehalt. Die Bakterien, die im Rahmen dieser Studie als potentielle Kontaminanten identifiziert wurden, sind teilweise bereits in anderen Mikrobiomstudien als solche beschrieben worden, wie etwa *Bradyrhizobiaceae* (LAURENCE et al., 2014), *Comamonadaceae*, *Ralstonia*, *Sediminibacterium*, *Achromobacter* oder *Pseudomonas* (SALTER et al., 2014). Diese Sequenzen, die prozentual überwiegend in den Negativkontrollen vorkamen, wurden vor der statistischen Analyse ausgeschlossen. Bei der gleichzeitigen Sequenzierung von Negativkontrollen und Proben kann eine Kontamination der Kontrollen durch das eigentliche Probenmaterial allerdings nicht ausgeschlossen werden. Daher wird in aktuellen Publikationen diskutiert, dass der Ausschluss aller Sequenzen, die in Negativkontrollen zu finden sind, zu einer Überschätzung der Kontamination aus Extraktionskits und Tupfern führen

---

könnte (EDMONDS & WILLIAMS, 2017).

## V. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der durchgeführten Studie war es, das nasale Mikrobiom von gesunden Hunden zu charakterisieren und es mit dem von Hunden mit nasalen Neoplasien oder chronischer Rhinitis mittels 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung zu vergleichen.

Sowohl bei gesunden als auch bei erkrankten Tieren konnte ein sehr diverses Mikrobiom mit zahlreichen „Operational Taxonomic Units“ in der Nasenhöhle nachgewiesen werden. Häufigster Stamm war in allen drei Gruppen Proteobacteria, gefolgt von Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria und Cyanobacteria in unterschiedlicher Häufigkeit. In der Gruppe der gesunden Hunde dominierten auf Genus-Ebene *Moraxella*, gefolgt von *Phyllobacterium*, *Cardiobacteriaceae* und *Staphylococcus*. Während *Moraxella* spp. in der Gruppe der erkrankten Hunde im Vergleich zu den gesunden Tieren signifikant weniger vertreten waren, traten *Pasteurellaceae* bei Hunden mit nasalen Erkrankungen signifikant häufiger auf. Die Ähnlichkeitsanalyse der phylogenetischen „Unifrac distance metrics“ ergab signifikant unterschiedliche mikrobielle Gemeinschaften bei gesunden Hunden und Hunden mit nasalen Neoplasien.

Beim Vergleich von Umgebungs- und individuellen Faktoren wie Alter, Körpergewicht, Geschlecht, Rasse, Nasenlänge und Anzahl der Hunde im Haushalt bei gesunden Tieren zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Innerhalb der Gruppe von Hunden mit Nasentumoren ergab der Vergleich von Hunden mit und ohne antibiotische Vorbehandlung keinen signifikanten Unterschied in der Zusammensetzung des nasalen Mikrobioms, einzelne bakterielle Taxa waren jedoch signifikant stärker mit vorangegangener Antibiotikatherapie assoziiert.

Die Ergebnisse der Studie zeigen, dass die Nasenhöhle des Hundes von einer speziereichen Bakteriengemeinschaft besiedelt ist. Des Weiteren konnten Unterschiede im nasalen Mikrobiom gesunder Hunde im Vergleich zu Hunden mit nasalen Erkrankungen dargestellt werden. Die komplexen Interaktionen zwischen Immunsystem des Wirtes und nasalem Mikrobiom pathogenetisch einzuordnen, bleibt Gegenstand zukünftiger Untersuchungen.

## VI. SUMMARY

Aim of the study was to characterize the nasal microbiome of healthy dogs and compare it to that of dogs with nasal neoplasia and chronic rhinitis, using 16S rRNA amplicon sequencing.

Inside the nasal cavity of healthy as well as of diseased animals a diverse microbiome with numerous Operational Taxonomic Units could be detected. Proteobacteria was the most abundant phylum in all three groups, followed by Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria and Cyanobacteria in different relative abundance. In healthy dogs, *Moraxella* spp. were the most common species, followed by *Phyllobacterium* spp., *Cardiobacteriaceae*, and *Staphylococcus* spp. While *Moraxella* spp. were significantly decreased in diseased compared to healthy dogs, *Pasteurellaceae* were significantly increased.

Analysis of similarities used on the phylogenetic unweighted UniFrac distance metric was significantly different when nasal microbial communities of healthy dogs were compared to those of dogs with nasal neoplasia.

Comparing environmental and individual factors like age, body weight, sex, breed, cephalic index and number of dogs living in the same household within the healthy population, no significant differences could be observed.

Within the dogs with nasal neoplasia, comparing dogs with and without history of antibiotic treatment showed no significant different microbial composition, but several bacterial taxa were higher represented in either dogs without or under antibiotic therapy.

The study showed that the canine nasal cavity is inhabited by a highly species-rich bacterial community, and suggests significant differences between the nasal microbiome of healthy dogs and dogs with nasal disease. Further studies are warranted to elucidate the complex interactions between nasal microbiome, host immune response, and diseases of the canine nasal cavity.

## VII. LITERATURVERZEICHNIS

Abramson AL, D'Amato RF, Isenberg HD, Pryor WH. Microbiology of the canine nasal cavities. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1976; 85: 394-7.

Abramson AL, Isenberg HD, McDermott LM. Microbiology of the canine nasal cavities. *Rhinology* 1980; 18: 143-50.

Abreu NA, Nagalingam NA, Song Y, Roediger FC, Pletcher SD, Goldberg AN, Lynch SV. Sinus microbiome diversity depletion and *Corynebacterium tuberculo*stearicum enrichment mediates rhinosinusitis. *Sci Transl Med* 2012; 4: 151ra24.

Acheson ED, Cowdell RH, Hadfield E, Macbeth RG. Nasal cancer in woodworkers in the furniture industry. *Br Med J* 1968; 2: 587-96.

Acinas SG, Marcelino LA, Klepac-Ceraj V, Polz MF. Divergence and redundancy of 16S rRNA sequences in genomes with multiple *rrn* operons. *J Bacteriol* 2004; 186: 2629-35.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995; 59: 143-69.

Amigot JA, Torremorell M, Pijoan C. Evaluation of techniques for the detection of toxigenic *Pasteurella multocida* strains from pigs. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 169-73.

Anderson M, Stokken J, Sanford T, Aurora R, Sindwani R. A systematic review of the sinonasal microbiome in chronic rhinosinusitis. *Am J Rhinol Allergy* 2016; 30: 161-6.

Aurora R, Chatterjee D, Hentzleman J, Prasad G, Sindwani R, Sanford T. Contrasting the microbiomes from healthy volunteers and patients with chronic

rhinosinusitis. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 139: 1328-38.

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347: 911-20.

Bailie WE, Stowe EC, Schmitt AM. Aerobic bacterial flora of oral and nasal fluids of canines with reference to bacteria associated with bites. *J Clin Microbiol* 1978; 7: 223-31.

Balish E, Cleven D, Brown J, Yale CE. Nose, throat, and fecal flora of beagle dogs housed in "locked" or "open" environments. *Appl Environ Microbiol* 1977; 34: 207-21.

Barshak MB, Durand ML. The role of infection and antibiotics in chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope Invest Otolaryngol* 2017; 2: 36-42.

Bassiouni A, Cleland EJ, Psaltis AJ, Vreugde S, Wormald PJ. Sinonasal microbiome sampling: a comparison of techniques. *PLoS One* 2015; 10: e0123216.

Bassis CM, Tang AL, Young VB, Pynnonen MA. The nasal cavity microbiota of healthy adults. *Microbiome* 2014; 2: 27.

Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, Beck JM, Curtis JL, Huffnagle GB. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio* 2015; 6: e00037.

Batsakis J (1979) Tumours of the head and neck : clinical and patho- logical considerations. Williams and Wilkins, Baltimore

Birzele LT, Depner M, Ege MJ, Engel M, Kublik S, Bernau C, Loss GJ, Genuneit J, Horak E, Schlöter M, Braun-Fahrlander C, Danielewicz H, Heederik D, von Mutius E, Legatzki A. Environmental and mucosal microbiota and their role in

childhood asthma. *Allergy* 2017; 72: 109-19.

Biswas K, Hoggard M, Jain R, Taylor MW, Douglas RG. The nasal microbiota in health and disease: variation within and between subjects. *Front Microbiol* 2015; 9: 134.

Blekhman R, Goodrich JK, Huang K, Sun Q, Bukowski R, Bell JT, Spector TD, Keinan A, Ley RE, Gevers D, Clark AG. Host genetic variation impacts microbiome composition across human body sites. *Genome Biol* 2015; 16: 191.

Boase S, Foreman A, Cleland E, Tan L, Melton-Kreft R, Pant H, Hu FZ, Ehrlich GD, Wormald PJ. The microbiome of chronic rhinosinusitis: culture, molecular diagnostics and biofilm detection. *BMC Infect Dis* 2013; 13: 210.

Borges-Canha M, Portela-Cidade JP, Dinis-Ribeiro M, Leite-Moreira AF, Pimentel-Nunes P. Role of colonic microbiota in colorectal carcinogenesis: A systematic review. *Rev Esp Enferm Dig* 2015; 107

Brook I. The role of bacterial interference in otitis, sinusitis and tonsillitis. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2005; 133: 139-46.

Brosinski K, Janik D, Polkinghorne A, Von Bomhard W, Schmahl W. Olfactory neuroblastoma in dogs and cats--a histological and immunohistochemical analysis. *J Comp Pathol* 2012; 146: 152-9.

Bruns A, Nubel U, Cypionka H, Overmann J. Effect of signal compounds and incubation conditions on the culturability of freshwater bacterioplankton. *Appl Environ Microbiol* 2003; 69: 1980-9.

Brunstein J. Quantitative PCR methods. *MLO Med Lab Obs* 2013; 45: 32, 4.

Bukowski JA, Wartenberg D, Goldschmidt M. Environmental causes for sinonasal cancers in pet dogs, and their usefulness as sentinels of indoor cancer risk. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 54: 579-91.

Burgener D, Slocombe R, Zerbe C. Lymphoplasmacytic rhinitis in five dogs. *J Am Hosp Assoc* 1987; 23: 565-8.

Camanocha A, Dewhirst FE. Host-associated bacterial taxa from *Chlorobi*, *Chloroflexi*, *GN02*, *Synergistetes*, *SR1*, *TM7*, and *WPS-2* Phyla/candidate divisions. *J Oral Microbiol* 2014; 6

Camarinha-Silva A, Jauregui R, Chaves-Moreno D, Oxley AP, Schaumburg F, Becker K, Wos-Oxley ML, Pieper DH. Comparing the anterior nare bacterial community of two discrete human populations using Illumina amplicon sequencing. *Environ Microbiol* 2014; 16: 2939-52.

Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JJ, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunenko T, Zaneveld J, Knight R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010; 7: 335-6.

Cardona S, Eck A, Cassellas M, Gallart M, Alastrue C, Dore J, Azpiroz F, Roca J, Guarner F, Manichanh C. Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis. *BMC Microbiol* 2012; 12: 158.

Carroll IM, Ringel-Kulka T, Siddle JP, Klaenhammer TR, Ringel Y. Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage. *PLoS One* 2012; 7: e46953.

Chao A. Non-parametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics* 1984; 11: 265-70.

Choi CH, Poroyko V, Watanabe S, Jiang D, Lane J, deTineo M, Baroody FM, Naclerio RM, Pinto JM. Seasonal allergic rhinitis affects sinonasal microbiota. *Am J Rhinol Allergy* 2014a; 28: 281-6.



Choi EB, Hong SW, Kim DK, Jeon SG, Kim KR, Cho SH, Gho YS, Jee YK, Kim YK. Decreased diversity of nasal microbiota and their secreted extracellular vesicles in patients with chronic rhinosinusitis based on a metagenomic analysis. *Allergy* 2014b; 69: 517-26.

Claesson MJ, Wang Q, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, Cole JR, Ross RP, O'Toole PW. Comparison of two next-generation sequencing technologies for resolving highly complex microbiota composition using tandem variable 16S rRNA gene regions. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: e200.

Clapper WE, Meade GH. NORMAL FLORA OF THE NOSE, THROAT, AND LOWER INTESTINE OF DOGS. *J Bacteriol* 1963; 85: 643-8.

Cleland EJ, Drilling A, Bassiouni A, James C, Vreugde S, Wormald PJ. Probiotic manipulation of the chronic rhinosinusitis microbiome. *Int Forum Allergy Rhinol* 2014; 4: 309-14.

Cleland EJ, Bassiouni A, Vreugde S, Wormald PJ. The bacterial microbiome in chronic rhinosinusitis: Richness, diversity, postoperative changes, and patient outcomes. *Am J Rhinol Allergy* 2016; 30: 37-43.

Cohn LA, Reinero CR. Respiratory defenses in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2007; 37: 845-60, v.

Cohn LA. Canine nasal disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2014; 44: 75-89.

Coil DA, Alexiev A, Wallis C, O'Flynn C, Deusch O, Davis I, Horsfall A, Kirkwood N, Jospin G, Eisen JA, Harris S, Darling AE. Draft genome sequences of 26 porphyromonas strains isolated from the canine oral microbiome. *Genome Announc* 2015; 3

Cole JR, Wang Q, Fish JA, Chai B, McGarrell DM, Sun Y, Brown CT, Porras-Alfaro A, Kuske CR, Tiedje JM. Ribosomal Database Project: data and tools for

high throughput rRNA analysis. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: D633-42.

Comba P, Belli S. [Etiological epidemiology of tumors of the nasal cavities and the paranasal sinuses]. *Ann Ist Super Sanita* 1992; 28: 121-32.

Cope EK, Lynch SV. Novel microbiome-based therapeutics for chronic rhinosinusitis. *Curr Allergy Asthma Rep* 2015; 15: 504.

Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JI, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science* 2009; 326: 1694-7.

Davis IJ, Bull C, Horsfall A, Morley I, Harris S. The Unculturables: targeted isolation of bacterial species associated with canine periodontal health or disease from dental plaque. *BMC Microbiol* 2014; 14: 196.

DeConde AS, Soler ZM. Chronic rhinosinusitis: Epidemiology and burden of disease. *Am J Rhinol Allergy* 2016; 30: 134-9.

DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 5069-72.

Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 2007; 449: 811-8.

Dorn ES, Tress B, Suchodolski JS, Nisar T, Ravindran P, Weber K, Hartmann K, Schulz BS. Bacterial microbiome in the nose of healthy cats and in cats with nasal disease. *PLoS One* 2017; 12: e0180299.

Dowd SE, Sun Y, Wolcott RD, Domingo A, Carroll JA. Bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) for microbiome studies: bacterial diversity in the ileum of newly weaned *Salmonella*-infected pigs. *Foodborne*

Pathog Dis 2008; 5: 459-72.

Downey TJ, Clark SK, Moore DW. Chondrosarcoma of the nasal septum. Otolaryngol Head Neck Surg 2001; 125: 98-100.

Edmonds K, Williams L. The Role of the Negative Control in Microbiome Analyses. The FASEB Journal 2017; 31: 940.3.

Ericsson AC, Personett AR, Grobman ME, Rindt H, Reinero CR. Composition and Predicted Metabolic Capacity of Upper and Lower Airway Microbiota of Healthy Dogs in Relation to the Fecal Microbiota. PLoS One 2016; 11: e0154646.

Feazel LM, Robertson CE, Ramakrishnan VR, Frank DN. Microbiome complexity and Staphylococcus aureus in chronic rhinosinusitis. Laryngoscope 2012; 122: 467-72.

Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2012; 9: 577-89.

Fokkens WJ, Lund VJ, Mullol J, Bachert C, Alobid I, Baroody F, Cohen N, Cervin A, Douglas R, Gevaert P, Georgalas C, Goossens H, Harvey R, Hellings P, Hopkins C, Jones N, Joos G, Kalogjera L, Kern B, Kowalski M, Price D, Riechelmann H, Schlosser R, Senior B, Thomas M, Toskala E, Voegels R, Wang de Y, Wormald PJ. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyps 2012. Rhinol Suppl 2012; 23: 3 p preceding table of contents, 1-298.

Foreman A, Boase S, Psaltis A, Wormald PJ. Role of bacterial and fungal biofilms in chronic rhinosinusitis. Curr Allergy Asthma Rep 2012; 12: 127-35.

Frank DN, Feazel LM, Bessesen MT, Price CS, Janoff EN, Pace NR. The human nasal microbiota and Staphylococcus aureus carriage. PLoS One 2010; 5: e10598.

Franz CM, Huch M, Seifert S, Kramlich J, Bub A, Cho GS, Watzl B. Influence of a probiotic Lactobacillus casei strain on the colonisation with potential pathogenic

streptococci and *Staphylococcus aureus* in the nasopharyngeal space of healthy men with a low baseline NK cell activity. *Med Microbiol Immunol* 2015; 204: 527-38.

Gallego V, Garcia MT, Ventosa A. *Methylobacterium adhaesivum* sp. nov., a methylotrophic bacterium isolated from drinking water. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56: 339-42.

Garcia-Rodriguez JA, Fresnadillo Martinez MJ. Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50 Suppl S2: 59-73.

Garrett WS. Cancer and the microbiota. *Science* 2015; 348: 80-6.

Garza DR, Dutilh BE. From cultured to uncultured genome sequences: metagenomics and modeling microbial ecosystems. *Cell Mol Life Sci* 2015; 72: 4287-308.

Genitsaris S, Kormas KA, Moustaka-Gouni M. Airborne algae and cyanobacteria: occurrence and related health effects. *Front Biosci (Elite Ed)* 2011; 3: 772-87.

Geurkink N. Nasal anatomy, physiology, and function. *J Allergy Clin Immunol* 1983; 72: 123-8.

Gilain L, Houette A, Montalban A, Mom T, Saroul N. Mucosal melanoma of the nasal cavity and paranasal sinuses. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2014; 131: 365-9.

Goldstein-Daruech N, Cope EK, Zhao KQ, Vukovic K, Kofonow JM, Doghramji L, Gonzalez B, Chiu AG, Kennedy DW, Palmer JN, Leid JG, Kreindler JL, Cohen NA. Tobacco smoke mediated induction of sinonasal microbial biofilms. *PLoS One* 2011; 6: e15700.

Gong H, Shi Y, Zhou X, Wu C, Cao P, Xu C, Hou D, Wang Y, Zhou L.

Microbiota in the Throat and Risk Factors for Laryngeal Carcinoma. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80: 7356-63.

Govindaraj S, Wang H. Does human papilloma virus play a role in sinonasal inverted papilloma? *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2014; 22: 47-51.

Greenblum S, Turnbaugh PJ, Borenstein E. Metagenomic systems biology of the human gut microbiome reveals topological shifts associated with obesity and inflammatory bowel disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 594-9.

Greene C, Reinero C. Bacterial respiratory infections. In: *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, 3rd edn. CE G, ed. Missouri: Saunders-Elsevier 2006: 866–82.

Grice EA, Segre JA. The human microbiome: our second genome. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2012; 13: 151-70.

Gronvold AM, L'Abee-Lund TM, Sorum H, Skancke E, Yannarell AC, Mackie RI. Changes in fecal microbiota of healthy dogs administered amoxicillin. *FEMS Microbiol Ecol* 2010; 71: 313-26.

Grzeskowiak L, Endo A, Beasley S, Salminen S. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe* 2015; 34: 14-23.

Guo J, Cole JR, Zhang Q, Brown CT, Tiedje JM. Microbial Community Analysis with Ribosomal Gene Fragments from Shotgun Metagenomes. *Appl Environ Microbiol* 2015; 82: 157-66.

Ha PK, Eisele DW, Frassica FJ, Zahurak ML, McCarthy EF. Osteosarcoma of the head and neck: a review of the Johns Hopkins experience. *Laryngoscope* 1999; 109: 964-9.

Habermann W, Zimmermann K, Skarabis H, Kunze R, Rusch V. [Reduction of acute recurrence in patients with chronic recurrent hypertrophic sinusitis by treatment with a bacterial immunostimulant (*Enterococcus faecalis* Bacteriae of

human origin]. *Arzneimittelforschung* 2002; 52: 622-7.

Handa O, Naito Y, Yoshikawa T. *Helicobacter pylori*: a ROS-inducing bacterial species in the stomach. *Inflamm Res* 2010; 59: 997-1003.

Hasegawa K, Camargo CA, Jr. Airway microbiota and acute respiratory infection in children. *Expert Rev Clin Immunol* 2015; 11: 789-92.

Hauser LJ, Ir D, Kingdom TT, Robertson CE, Frank DN, Ramakrishnan VR. Investigation of bacterial repopulation after sinus surgery and perioperative antibiotics. *Int Forum Allergy Rhinol* 2016; 6: 34-40.

Hawkins EC, Johnson LR, Guptill L, Marr HS, Breitschwerdt EB, Birkenheuer AJ. Failure to identify an association between serologic or molecular evidence of *Bartonella* infection and idiopathic rhinitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233: 597-9.

Hicks DG, Fidel JL. Intranasal malignant melanoma in a dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 2006; 42: 472-6.

Hiergeist A, Glasner J, Reischl U, Gessner A. Analyses of Intestinal Microbiota: Culture versus Sequencing. *Ilar j* 2015; 56: 228-40.

Hoffmann AR, Proctor LM, Surette MG, Suchodolski JS. The Microbiome: The Trillions of Microorganisms That Maintain Health and Cause Disease in Humans and Companion Animals. *Vet Pathol* 2016; 53: 10-21.

Hoggard M, Biswas K, Zoing M, Wagner Mackenzie B, Taylor MW, Douglas RG. Evidence of microbiota dysbiosis in chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2017; 7: 230-9.

Hu Y, Yang X, Qin J, Lu N, Cheng G, Wu N, Pan Y, Li J, Zhu L, Wang X, Meng Z, Zhao F, Liu D, Ma J, Qin N, Xiang C, Xiao Y, Li L, Yang H, Wang J, Yang R, Gao GF, Wang J, Zhu B. Metagenome-wide analysis of antibiotic resistance genes

in a large cohort of human gut microbiota. *Nat Commun* 2013; 4: 2151.

Hugenholtz P, Goebel BM, Pace NR. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J Bacteriol* 1998; 180: 4765-74.

Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012; 486: 207-14.

Inglis GD, Thomas MC, Thomas DK, Kalmokoff ML, Brooks SP, Selinger LB. Molecular methods to measure intestinal bacteria: a review. *J AOAC Int* 2012; 95: 5-23.

Isaiah A, Hoffmann AR, Kelley R, Mundell P, Steiner JM, Suchodolski JS. Characterization of the nasal and oral microbiota of detection dogs. *PLoS One* 2017; 12: e0184899.

Jakobsson HE, Jernberg C, Andersson AF, Sjolund-Karlsson M, Jansson JK, Engstrand L. Short-term antibiotic treatment has differing long-term impacts on the human throat and gut microbiome. *PLoS One* 2010; 5: e9836.

Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2761-4.

Jaspers I. Cigarette smoke effects on innate immune mechanisms in the nasal mucosa. Potential effects on the microbiome. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11 Suppl 1: S38-42.

Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *Isme j* 2007; 1: 56-66.

Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, Martin R, Odriozola JM, Nueno-Palop C,

Narbad A, Olivares M, Xaus J, Rodriguez JM. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 2005; 51: 270-4.

Johnson CL, Versalovic J. The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics* 2012; 129: 950-60.

Joss TV, Burke CM, Hudson BJ, Darling AE, Forer M, Alber DG, Charles IG, Stow NW. Bacterial Communities Vary between Sinuses in Chronic Rhinosinusitis Patients. *Front Microbiol* 2015; 6: 1532.

Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group. Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research. *PLoS One* 2012; 7: e39315.

Kaldrymidou E, Papaioannou N, Poutahidis T, Karayannopoulou M, Gruys E, Toliou T, Tsangaris T. Malignant lymphoma in nasal cavity and paranasal sinuses of a dog. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 2000; 47: 457-62.

Kaspar U, Kriegeskorte A, Schubert T, Peters G, Rudack C, Pieper DH, Wos-Oxley M, Becker K. The culturome of the human nose habitats reveals individual bacterial fingerprint patterns. *Environ Microbiol* 2015;

Kim D, Hofstaedter CE, Zhao C, Mattei L, Tanes C, Clarke E, Lauder A, Sherrill-Mix S, Chehoud C, Kelsen J, Conrad M, Collman RG, Baldassano R, Bushman FD, Bittinger K. Optimizing methods and dodging pitfalls in microbiome research. *Microbiome* 2017; 5: 52.

Kim R, Freeman J, Waldvogel-Thurlow S, Roberts S, Douglas R. The characteristics of intramucosal bacteria in chronic rhinosinusitis: a prospective cross-sectional analysis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2013; 3: 349-54.

Kitz R, Martens U, Ziesenik E, Enck P, Rose M. Probiotic *E. faecalis*: adjuvant therapy in children with recurrent rhinosinusitis. *Central European Journal of*



Medicine 2012; 7(3): 362–5.

Klappenbach JA, Saxman PR, Cole JR, Schmidt TM. rrndb: the Ribosomal RNA Operon Copy Number Database. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 181-4.

Klindworth A, Pruesse E, Schweer T, Peplies J, Quast C, Horn M, Glockner FO. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: e1.

Kopczynski ED, Bateson MM, Ward DM. Recognition of chimeric small-subunit ribosomal DNAs composed of genes from uncultivated microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 746-8.

Kostic AD, Chun E, Robertson L, Glickman JN, Gallini CA, Michaud M, Clancy TE, Chung DC, Lochhead P, Hold GL, El-Omar EM, Brenner D, Fuchs CS, Meyerson M, Garrett WS. *Fusobacterium nucleatum* potentiates intestinal tumorigenesis and modulates the tumor-immune microenvironment. *Cell Host Microbe* 2013; 14: 207-15.

Krivan HC, Roberts DD, Ginsburg V. Many pulmonary pathogenic bacteria bind specifically to the carbohydrate sequence GalNAc beta 1-4Gal found in some glycolipids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 6157-61.

Kubatzky KF, Kloos B, Hildebrand D. Signaling cascades of *Pasteurella multocida* toxin in immune evasion. *Toxins (Basel)* 2013; 5: 1664-81.

Kurata K, Maeda S, Yasunaga S, Masuda K, Sakaguchi M, Ohno K, Tsujimoto H. Immunological findings in 3 dogs clinically diagnosed with allergic rhinitis. *J Vet Med Sci* 2004; 66: 25-9.

Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, Stahl DA, Sogin ML, Pace NR. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985; 82: 6955-9.

Langille MG, Zaneveld J, Caporaso JG, McDonald D, Knights D, Reyes JA, Clemente JC, Burkepille DE, Vega Thurber RL, Knight R, Beiko RG, Huttenhower C. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol* 2013; 31: 814-21.

Lauber CL, Zhou N, Gordon JI, Knight R, Fierer N. Effect of storage conditions on the assessment of bacterial community structure in soil and human-associated samples. *FEMS Microbiol Lett* 2010; 307: 80-6.

Laurence M, Hatzis C, Brash DE. Common contaminants in next-generation sequencing that hinder discovery of low-abundance microbes. *PLoS One* 2014; 9: e97876.

Le Boedec K. A systematic review and meta-analysis of the association between *Mycoplasma* spp and upper and lower respiratory tract disease in cats. *J Am Vet Med Assoc* 2017; 250: 397-407.

Lederberg J, McCray A. 'Ome Sweet 'Omics - A Genealogical Treasury of Words. *The Scientist* 2001; 15[7]:8

Lefebvre J, Kuehn NF, Wortinger A. Computed tomography as an aid in the diagnosis of chronic nasal disease in dogs. *J Small Anim Pract* 2005; 46: 280-5.

Lemon KP, Klepac-Ceraj V, Schiffer HK, Brodie EL, Lynch SV, Kolter R. Comparative analyses of the bacterial microbiota of the human nostril and oropharynx. *MBio* 2010; 1

Lemon KP, Armitage GC, Relman DA, Fischbach MA. Microbiota-targeted therapies: an ecological perspective. *Sci Transl Med* 2012; 4: 137rv5.

Li K, Bihan M, Yooseph S, Methe BA. Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. *PLoS One* 2012; 7: e32118.

Liao D. Gene conversion drives within genic sequences: concerted evolution of

ribosomal RNA genes in bacteria and archaea. *J Mol Evol* 2000; 51: 305-17.

Lim M, Citardi MJ, Leong JL. Topical antimicrobials in the management of chronic rhinosinusitis: a systematic review. *Am J Rhinol* 2008; 22: 381-9.

Lima SF, Teixeira AG, Higgins CH, Lima FS, Bicalho RC. The upper respiratory tract microbiome and its potential role in bovine respiratory disease and otitis media. *Sci Rep* 2016; 6: 29050.

Lippmann M, Yeates DB, Albert RE. Deposition, retention, and clearance of inhaled particles. *Br J Ind Med* 1980; 37: 337-62.

Liu CM, Soldanova K, Nordstrom L, Dwan MG, Moss OL, Contente-Cuomo TL, Keim P, Price LB, Lane AP. Medical therapy reduces microbiota diversity and evenness in surgically recalcitrant chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2013a; 3: 775-81.

Liu CM, Price LB, Hungate BA, Abraham AG, Larsen LA, Christensen K, Stegger M, Skov R, Andersen PS. *Staphylococcus aureus* and the ecology of the nasal microbiome. *Sci Adv* 2015; 1: e1400216.

Liu H, Wang H, Huang M, Mei Y, Gu B, Wu R, Huang Y, Chen Y, Xu Y, Wang T. Analysis of antimicrobial resistance and class 1 integrons among strains from upper respiratory tract of healthy adults. *J Thorac Dis* 2013b; 5: 149-55.

Lobetti R. Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in 33 dogs. *J S Afr Vet Assoc* 2014; 85: 1151.

Lobetti RG. A retrospective study of chronic nasal disease in 75 dogs. *J S Afr Vet Assoc* 2009; 80: 224-8.

Lofmark S, Jernberg C, Jansson JK, Edlund C. Clindamycin-induced enrichment and long-term persistence of resistant *Bacteroides* spp. and resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 1160-7.

Logares R, Sunagawa S, Salazar G, Cornejo-Castillo FM, Ferrera I, Sarmiento H, Hingamp P, Ogata H, de Vargas C, Lima-Mendez G, Raes J, Poulain J, Jaillon O, Wincker P, Kandels-Lewis S, Karsenti E, Bork P, Acinas SG. Metagenomic 16S rDNA Illumina tags are a powerful alternative to amplicon sequencing to explore diversity and structure of microbial communities. *Environ Microbiol* 2014; 16: 2659-71.

Luce D, Leclerc A, Morcet JF, Casal-Lareo A, Gerin M, Brugere J, Haguenoer JM, Goldberg M. Occupational risk factors for sinonasal cancer: a case-control study in France. *Am J Ind Med* 1992; 21: 163-75.

Lund VJ, Stammberger H, Nicolai P, Castelnovo P, Beal T, Beham A, Bernal-Sprekelsen M, Braun H, Cappabianca P, Carrau R, Cavallo L, Clarici G, Draf W, Esposito F, Fernandez-Miranda J, Fokkens W, Gardner P, Gellner V, Hellquist H, Hermann P, Hosemann W, Howard D, Jones N, Jorissen M, Kassam A, Kelly D, Kurschel-Lackner S, Leong S, McLaughlin N, Maroldi R, Minovi A, Mokry M, Onerci M, Ong YK, Prevedello D, Saleh H, Sehti DS, Simmen D, Snyderman C, Solares A, Spittle M, Stamm A, Tomazic P, Trimarchi M, Unger F, Wormald PJ, Zanation A. European position paper on endoscopic management of tumours of the nose, paranasal sinuses and skull base. *Rhinol Suppl* 2010; 22: 1-143.

Luoto R, Ruuskanen O, Waris M, Kalliomaki M, Salminen S, Isolauri E. Prebiotic and probiotic supplementation prevents rhinovirus infections in preterm infants: a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133: 405-13.

Magnani C, Ciambellotti E, Salvi U, Zanetti R, Comba P. [The incidence of tumors of the nasal cavity and the paranasal sinuses in the district of Biella, 1970-1986]. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 1989; 9: 511-9.

Mahdavinia M, Keshavarzian A, Tobin MC, Landay AL, Schleimer RP. A comprehensive review of the nasal microbiome in chronic rhinosinusitis (CRS). *Clin Exp Allergy* 2016; 46: 21-41.

Malinowski C. Canine and feline nasal neoplasia. *Clin Tech Small Anim Pract* 2006; 21: 89-94.

Martensson A, Abolhalaj M, Lindstedt M, Martensson A, Olofsson TC, Vasquez A, Greiff L, Cervin A. Clinical efficacy of a topical lactic acid bacterial microbiome in chronic rhinosinusitis: A randomized controlled trial. *Laryngoscope Invest Otolaryngol* 2017; 2: 410-6.

Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 560-4.

Maxfield AZ, Korkmaz H, Gregorio LL, Busaba NY, Gray ST, Holbrook EH, Guo R, Bleier BS. General antibiotic exposure is associated with increased risk of developing chronic rhinosinusitis. *Laryngoscope* 2017; 127: 296-302.

Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005; 122: 107-18.

Mercier E, Peters IR, Billen F, Battaille G, Clercx C, Day MJ, Peeters D. Potential role of *Alternaria* and *Cladosporium* species in canine lymphoplasmacytic rhinitis. *J Small Anim Pract* 2013; 54: 179-83.

Merkley MA, Bice TC, Grier A, Strohl AM, Man LX, Gill SR. The effect of antibiotics on the microbiome in acute exacerbations of chronic rhinosinusitis. *Int Forum Allergy Rhinol* 2015; 5: 884-93.

Metzker ML. Emerging technologies in DNA sequencing. *Genome Res* 2005; 15: 1767-76.

Mika M, Mack I, Korten I, Qi W, Aebi S, Frey U, Latzin P, Hilty M. Dynamics of the nasal microbiota in infancy: a prospective cohort study. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 905-12.e11.

Mitra A, MacIntyre DA, Lee YS, Smith A, Marchesi JR, Lehne B, Bhatia R, Lyons D, Paraskevaidis E, Li JV, Holmes E, Nicholson JK, Bennett PR, Kyrgiou M. Cervical intraepithelial neoplasia disease progression is associated with

increased vaginal microbiome diversity. *Sci Rep* 2015; 5: 16865.

Muir CS, Nectoux J. Descriptive epidemiology of malignant neoplasms of nose, nasal cavities, middle ear and accessory sinuses. *Clin Otolaryngol Allied Sci* 1980; 5: 195-211.

Mukerji SS, Pynnonen MA, Kim HM, Singer A, Tabor M, Terrell JE. Probiotics as adjunctive treatment for chronic rhinosinusitis: a randomized controlled trial. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2009; 140: 202-8.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1986; 51 Pt 1: 263-73.

Munier AL, de Lastours V, Barbier F, Chau F, Fantin B, Ruimy R. Comparative dynamics of the emergence of fluoroquinolone resistance in staphylococci from the nasal microbiota of patients treated with fluoroquinolones according to their environment. *Int J Antimicrob Agents* 2015; 46: 653-9.

Naclerio RM, Baroody FM. Other Phenotypes and Treatment of Chronic Rhinosinusitis. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2016; 4: 613-20.

Nathan C. Antibiotics at the crossroads. *Nature* 2004; 431: 899-902.

Neeser JR, Granato D, Rouvet M, Servin A, Teneberg S, Karlsson KA. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology* 2000; 10: 1193-9.

Norman JM, Handley SA, Virgin HW. Kingdom-agnostic metagenomics and the importance of complete characterization of enteric microbial communities. *Gastroenterology* 2014; 146: 1459-69.

Norris AM, Laing EJ. Diseases of the nose and sinuses. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1985; 15: 865-90.

Ogilvie GK, LaRue SM. Canine and feline nasal and paranasal sinus tumors. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 1992; 22: 1133-44.

Ohno M, Okano I, Watsuji T, Kakinuma T, Ueda K, Beppu T. Establishing the independent culture of a strictly symbiotic bacterium *Symbiobacterium thermophilum* from its supporting *Bacillus* strain. *Biosci Biotechnol Biochem* 1999; 63: 1083-90.

Olsen GJ, Lane DJ, Giovannoni SJ, Pace NR, Stahl DA. Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annu Rev Microbiol* 1986; 40: 337-65.

Olsen K. Nose and sinus tumours. In: *Rhinologic diagnosis and treatment*. McCaffrey T, ed. New York: Thieme 1997: 334-59.

Ouwehand AC, Nermes M, Collado MC, Rautonen N, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics alleviate allergic rhinitis during the birch pollen season. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 3261-8.

Pallen MJ. Diagnostic metagenomics: potential applications to bacterial, viral and parasitic infections. *Parasitology* 2014; 141: 1856-62.

Pappalardo BL, Brown T, Gookin JL, Morrill CL, Breitschwerdt EB. Granulomatous disease associated with *Bartonella* infection in 2 dogs. *J Vet Intern Med* 2000; 14: 37-42.

Paul NC, Bargman SC, Moodley A, Nielsen SS, Guardabassi L. *Staphylococcus pseudintermedius* colonization patterns and strain diversity in healthy dogs: a cross-sectional and longitudinal study. *Vet Microbiol* 2012; 160: 420-7.

Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, Baker CC, Di Francesco V, Howcroft TK, Karp RW, Lunsford RD, Wellington CR, Belachew T, Wright M, Giblin C, David H, Mills M, Salomon R, Mullins C, Akolkar B, Begg L, Davis C, Grandison L, Humble M, Khalsa J, Little AR, Peavy H, Pontzer C, Portnoy M, Sayre MH,

Starke-Reed P, Zakhari S, Read J, Watson B, Guyer M. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* 2009; 19: 2317-23.

Piva S, Zanoni RG, Specchi S, Brunetti B, Florio D, Pietra M. Chronic rhinitis due to *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* in a dog. *Vet Rec* 2010; 167: 177-8.

Pool-Zobel B, Veeriah S, Bohmer FD. Modulation of xenobiotic metabolising enzymes by anticarcinogens -- focus on glutathione S-transferases and their role as targets of dietary chemoprevention in colorectal carcinogenesis. *Mutat Res* 2005; 591: 74-92.

Poretsky R, Rodriguez RL, Luo C, Tsementzi D, Konstantinidis KT. Strengths and limitations of 16S rRNA gene amplicon sequencing in revealing temporal microbial community dynamics. *PLoS One* 2014; 9: e93827.

Psaltis AJ, Wormald PJ. Therapy of Sinonasal Microbiome in CRS: A Critical Approach. *Curr Allergy Asthma Rep* 2017; 17: 59.

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118: 229-41.

Ramakrishnan VR, Feazel LM, Gitomer SA, Ir D, Robertson CE, Frank DN. The microbiome of the middle meatus in healthy adults. *PLoS One* 2013; 8: e85507.

Ramakrishnan VR, Hauser LJ, Feazel LM, Ir D, Robertson CE, Frank DN. Sinus microbiota varies among chronic rhinosinusitis phenotypes and predicts surgical outcome. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136: 334-42.e1.

Ranjan R, Rani A, Metwally A, McGee HS, Perkins DL. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 469: 967-77.



Rasmussen TT, Kirkeby LP, Poulsen K, Reinholdt J, Kilian M. Resident aerobic microbiota of the adult human nasal cavity. *Apmis* 2000; 108: 663-75.

Rautava S, Luoto R, Salminen S, Isolauri E. Microbial contact during pregnancy, intestinal colonization and human disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012; 9: 565-76.

Reif JS, Bruns C, Lower KS. Cancer of the nasal cavity and paranasal sinuses and exposure to environmental tobacco smoke in pet dogs. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 488-92.

Rendon MA, Saldana Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vazquez A, Kaper JB, Puente JL, Giron JA. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 10637-42.

Robbins KT, Ferlito A, Silver CE, Takes RP, Strojan P, Snyderman CH, de Bree R, Haigentz M, Jr., Langendijk JA, Rinaldo A, Shaha AR, Hanna EY, Werner JA, Suarez C. Contemporary management of sinonasal cancer. *Head Neck* 2011; 33: 1352-65.

Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 2007; 137: 830s-7s.

Rodrigues Hoffmann A, Patterson AP, Diesel A, Lawhon SD, Ly HJ, Elkins Stephenson C, Mansell J, Steiner JM, Dowd SE, Olivry T, Suchodolski JS. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS One* 2014; 9: e83197.

Roesch LF, Casella G, Simell O, Krischer J, Wasserfall CH, Schatz D, Atkinson MA, Neu J, Triplett EW. Influence of fecal sample storage on bacterial community diversity. *Open Microbiol J* 2009; 3: 40-6.

Rogghmann MC, Lydecker AD, Hittle L, DeBoy RT, Nowak RG, Johnson JK, Mongodin EF. Comparison of the Microbiota of Older Adults Living in Nursing Homes and the Community. *mSphere* 2017; 2

Rösch S, Kallies R, Chatzinotas A, Oechtering G (2017) Das nasale Mikrobiom normo- und brachyzephaler Hunde – Erste Ergebnisse. In: 20. Workshop des Arbeitskreises ‚Respiratorisches System‘ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) in Kooperation mit der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin (DPG), Stuttgart. 412-6

Rudolph K, Bice DE, Hey JA, McLeod RL. A model of allergic nasal congestion in dogs sensitized to ragweed. *Am J Rhinol* 2003; 17: 227-32.

Sachs JL, Mueller UG, Wilcox TP, Bull JJ. The evolution of cooperation. *Q Rev Biol* 2004; 79: 135-60.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239: 487-91.

Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt MF, Turner P, Parkhill J, Loman NJ, Walker AW. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol* 2014; 12: 87.

Sanders ME. Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clin Infect Dis* 2008; 46 Suppl 2: S58-61; discussion S144-51.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J Mol Biol* 1975; 94: 441-8.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 5463-7.

Santagati M, Scillato M, Patane F, Aiello C, Stefani S. Bacteriocin-producing oral streptococci and inhibition of respiratory pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012; 65: 23-31.

Saphir DA, Carter GR. Gingival flora of the dog with special reference to bacteria

associated with bites. J Clin Microbiol 1976; 3: 344-9.

Sarris PF, Trantas EA, Mpalantinaki E, Ververidis F, Goumas DE. *Pseudomonas viridiflava*, a multi host plant pathogen with significant genetic variation at the molecular level. PLoS One 2012; 7: e36090.

Scadding G, Hellings P, Alobid I, Bachert C, Fokkens W, van Wijk RG, Gevaert P, Guilemany J, Kalogjera L, Lund V, Mullol J, Passalacqua G, Toskala E, van Drunen C. Diagnostic tools in Rhinology EAACI position paper. Clin Transl Allergy 2011; 1: 2.

Schulz B, Hähner M, Werckenthin C, Hartmann K (2006) Bacterial species in the respiratory tract of dogs with respiratory disease - 800 cases. 24th symposium of the veterinary comparative respiratory society, 8.-10.10.2006. Jena

Schulz BS, Raufeisen K, Weber K, Laberke S, Hartmann K. Comparison of the prevalence of *Mycoplasma* species in dogs with and without respiratory disease. Berl Munch Tierarztl Wochenschr 2015; 128: 304-9.

Schumann W. Biotop Mensch: Wir sind besiedelt. Biologie in unserer Zeit 2011;

Sharpton TJ. An introduction to the analysis of shotgun metagenomic data. Front Plant Sci 2014; 5: 209.

Shilts MH, Rosas-Salazar C, Tovchigrechko A, Larkin EK, Torralba M, Akopov A, Halpin R, Peebles RS, Moore ML, Anderson LJ, Nelson KE, Hartert TV, Das SR. Minimally Invasive Sampling Method Identifies Differences in Taxonomic Richness of Nasal Microbiomes in Young Infants Associated with Mode of Delivery. Microb Ecol 2016; 71: 233-42.

Shin SH, Ponikau JU, Sherris DA, Congdon D, Frigas E, Homburger HA, Swanson MC, Gleich GJ, Kita H. Chronic rhinosinusitis: an enhanced immune response to ubiquitous airborne fungi. J Allergy Clin Immunol 2004; 114: 1369-75.

Shukla SK, Ye Z, Sandberg S, Reyes I, Fritsche TR, Keifer M. The nasal microbiota of dairy farmers is more complex than oral microbiota, reflects occupational exposure, and provides competition for staphylococci. *PLoS One* 2017; 12: e0183898.

Slifierz MJ, Friendship RM, Weese JS. Longitudinal study of the early-life fecal and nasal microbiotas of the domestic pig. *BMC Microbiol* 2015; 15: 184.

Smith JE. The aerobic bacteria of the nose and tonsils of healthy dogs. *J Comp Pathol* 1961; 71: 428-33.

Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 8951-6.

Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol* 1985; 39: 321-46.

Stallmach A, Vehreschild MJGT (2016) Mikrobiom - Wissensstand und Perspektiven. De Gruyter

Stephenson MF, Mfuna L, Dowd SE, Wolcott RD, Barbeau J, Poisson M, James G, Desrosiers M. Molecular characterization of the polymicrobial flora in chronic rhinosinusitis. *J Otolaryngol Head Neck Surg* 2010; 39: 182-7.

Stevens WW, Lee RJ, Schleimer RP, Cohen NA. Chronic rhinosinusitis pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 136: 1442-53.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *Bmj* 1989; 299: 1259-60.

Stressmann FA, Rogers GB, Chan SW, Howarth PH, Harries PG, Bruce KD, Salib RJ. Characterization of bacterial community diversity in chronic rhinosinusitis infections using novel culture-independent techniques. *Am J Rhinol*

Allergy 2011; 25: e133-40.

Stunzi H, Hauser B. Tumours of the nasal cavity. Bull World Health Organ 1976; 53: 257-63.

Su C, Lei L, Duan Y, Zhang KQ, Yang J. Culture-independent methods for studying environmental microorganisms: methods, application, and perspective. Appl Microbiol Biotechnol 2012; 93: 993-1003.

Suchodolski JS, Dowd SE, Westermarck E, Steiner JM, Wolcott RD, Spillmann T, Harmoinen JA. The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. BMC Microbiol 2009; 9: 210.

Suzuki M, Giovannoni S. Bias caused by template annealing in the amplification of mixtures of 16S rRNA genes by PCR. Appl Environ Microbiol 1996; 62: 625-30.

Syrjanen KJ. HPV infections in benign and malignant sinonasal lesions. J Clin Pathol 2003; 56: 174-81.

Takai K, Horikoshi K. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. Appl Environ Microbiol 2000; 66: 5066-72.

Tan NC, Foreman A, Jardeleza C, Douglas R, Vreugde S, Wormald PJ. Intracellular Staphylococcus aureus: the Trojan horse of recalcitrant chronic rhinosinusitis? Int Forum Allergy Rhinol 2013; 3: 261-6.

Tanner M, Goebel BM, Dojka MA, NR P. Specific Ribosomal DNA Sequences from Diverse Environmental Settings Correlate with Experimental Contaminants. Appl Environ Microbiol. 1998; Aug; 64(8): 3110-3. .

Theilgaard SA, Buchwald C, Ingeholm P, Kornum Larsen S, Eriksen JG, Sand

Hansen H. Esthesioneuroblastoma: a Danish demographic study of 40 patients registered between 1978 and 2000. *Acta Otolaryngol* 2003; 123: 433-9.

Thevaranjan N, Whelan FJ, Puchta A, Ashu E, Rossi L, Surette MG, Bowdish DM. *Streptococcus pneumoniae* colonization disrupts the microbial community within the upper respiratory tract of aging mice. *Infect Immun* 2016;

Thomas T, Gilbert J, Meyer F. Metagenomics - a guide from sampling to data analysis. *Microb Inform Exp* 2012; 2: 3.

Tilman D. Niche tradeoffs, neutrality, and community structure: a stochastic theory of resource competition, invasion, and community assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10854-61.

Torok ME, Peacock SJ. Rapid whole-genome sequencing of bacterial pathogens in the clinical microbiology laboratory--pipe dream or reality? *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2307-8.

Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol* 2008; 11: 442-6.

Tufano RP, Mokadam NA, Montone KT, Weinstein GS, Chalian AA, Wolf PF, Weber RS. Malignant tumors of the nose and paranasal sinuses: hospital of the University of Pennsylvania experience 1990-1997. *Am J Rhinol* 1999; 13: 117-23.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027-31.

Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449: 804-10.

Uenishi G, Fujita S, Ohashi G, Kato A, Yamauchi S, Matsuzawa T, Ushida K. Molecular analyses of the intestinal microbiota of chimpanzees in the wild and in

captivity. *Am J Primatol* 2007; 69: 367-76.

Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 129: 1204-8.

van Dijk EL, Auger H, Jaszczyszyn Y, Thermes C. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet* 2014; 30: 418-26.

Vetrovsky T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. *PLoS One* 2013; 8: e57923.

Vidal RW, Devaney K, Ferlito A, Rinaldo A, Carbone A. Sinonasal malignant lymphomas: a distinct clinicopathological category. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1999; 108: 411-9.

von Wintzingerode F, Gobel UB, Stackebrandt E. Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol Rev* 1997; 21: 213-29.

Wagenmann M, Naclerio RM. Anatomic and physiologic considerations in sinusitis. *J Allergy Clin Immunol* 1992; 90: 419-23.

Walther B, Hermes J, Cuny C, Wieler LH, Vincze S, Abou Elnaga Y, Stamm I, Kopp PA, Kohn B, Witte W, Jansen A, Conraths FJ, Semmler T, Eckmanns T, Lubke-Becker A. Sharing more than friendship--nasal colonization with coagulase-positive staphylococci (CPS) and co-habitation aspects of dogs and their owners. *PLoS One* 2012; 7: e35197.

Wang WL, Xu SY, Ren ZG, Tao L, Jiang JW, Zheng SS. Application of metagenomics in the human gut microbiome. *World J Gastroenterol* 2015; 21: 803-14.

Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 1990; 345: 63-5.

Wedley AL, Dawson S, Maddox TW, Coyne KP, Pinchbeck GL, Clegg P, Jamrozny D, Fielder MD, Donovan D, Nuttall T, Williams NJ. Carriage of *Staphylococcus* species in the veterinary visiting dog population in mainland UK: molecular characterisation of resistance and virulence. *Vet Microbiol* 2014; 170: 81-8.

Weese JS, Slifierz M, Jalali M, Friendship R. Evaluation of the nasal microbiota in slaughter-age pigs and the impact on nasal methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carriage. *BMC Vet Res* 2014; 10: 69.

Whelan FJ, Verschoor CP, Stearns JC, Rossi L, Luinstra K, Loeb M, Smieja M, Johnstone J, Surette MG, Bowdish DM. The loss of topography in the microbial communities of the upper respiratory tract in the elderly. *Ann Am Thorac Soc* 2014; 11: 513-21.

Whitton BA. Diversity, Ecology, and Taxonomy of the Cyanobacteria. In: *Photosynthetic Prokaryotes. Biotechnology Handbooks*. N.G. MNHC, ed. Boston, MA: Springer 1992:

Willing BP, Russell SL, Finlay BB. Shifting the balance: antibiotic effects on host-microbiota mutualism. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9: 233-43.

Willmann M, El-Hadidi M, Huson DH, Schutz M, Weidenmaier C, Autenrieth IB, Peter S. Antibiotic Selection Pressure Determination through Sequence-Based Metagenomics. *Antimicrob Agents Chemother* 2015; 59: 7335-45.

Windsor RC, Johnson LR, Herrgesell EJ, De Cock HE. Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in dogs: 37 cases (1997-2002). *J Am Vet Med Assoc* 2004; 224: 1952-7.

Windsor RC, Johnson LR. Canine chronic inflammatory rhinitis. *Clin Tech Small*



Anim Pract 2006; 21: 76-81.

Windsor RC, Johnson LR, Sykes JE, Drazenovich TL, Leutenegger CM, De Cock HE. Molecular detection of microbes in nasal tissue of dogs with idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis. J Vet Intern Med 2006; 20: 250-6.

Wipler J, Cermakova Z, Hanzalek T, Horakova H, Zemlickova H. [Sharing bacterial microbiota between owners and their pets (dogs, cats)]. Klin Mikrobiol Infekc Lek 2017; 23: 48-57.

Xu W, Yang L, Lee P, Huang WC, Nossa C, Ma Y, Deng FM, Zhou M, Melamed J, Pei Z. Mini-review: perspective of the microbiome in the pathogenesis of urothelial carcinoma. Am J Clin Exp Urol 2014; 2: 57-61.

Yan M, Pamp SJ, Fukuyama J, Hwang PH, Cho DY, Holmes S, Relman DA. Nasal microenvironments and interspecific interactions influence nasal microbiota complexity and *S. aureus* carriage. Cell Host Microbe 2013; 14: 631-40.

Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rossello-Mora R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. Nat Rev Microbiol 2014; 12: 635-45.

Yu G, Phillips S, Gail MH, Goedert JJ, Humphrys MS, Ravel J, Ren Y, Caporaso NE. The effect of cigarette smoking on the oral and nasal microbiota. Microbiome 2017; 5: 3.

Yu W, Yuan X, Xu X, Ding R, Pang L, Liu Y, Guo Y, Li H, Li M, Yuan J, Tang L, Wen S. Reduced airway microbiota diversity is associated with elevated allergic respiratory inflammation. Ann Allergy Asthma Immunol 2015; 115: 63-8.

Zarraonaindia I, Owens SM, Weisenhorn P, West K, Hampton-Marcell J, Lax S, Bokulich NA, Mills DA, Martin G, Taghavi S, van der Lelie D, Gilbert JA. The soil microbiome influences grapevine-associated microbiota. MBio 2015; 6

Zhu K, Levine RS, Brann EA, Hall HI, Caplan LS, Gnepp DR. Case-control study evaluating the homogeneity and heterogeneity of risk factors between sinonasal and nasopharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2002; 99: 119-23.

Zipperer A, Konnerth MC, Laux C, Berscheid A, Janek D, Weidenmaier C, Burian M, Schilling NA, Slavetinsky C, Marschal M, Willmann M, Kalbacher H, Schitteck B, Brotz-Oesterhelt H, Grond S, Peschel A, Krismer B. Human commensals producing a novel antibiotic impair pathogen colonization. *Nature* 2016; 535: 511-6.

Zoetendal EG, Akkermans ADL, Akkermans-van Vliet WM, de Visser JAGM, de Vos WM. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microb. Ecol. Health Dis* 2001; 13: 129–34.

Zylka S, Bien S, Kaminski B, Postula S, Ziolkowska M. [Epidemiology and clinical characteristics of the sinonasal malignancies]. *Otolaryngol Pol* 2008; 62: 436-41.

## VIII. DANKSAGUNG

Mein größter Dank geht an meine Doktormutter **Dr. Bianka Schulz**. In allen Phasen der Arbeit, von der Projektplanung über die praktische Durchführung bis zur Präsentation der Ergebnisse auf Kongressen, konnte ich mich auf ihre uneingeschränkte Unterstützung verlassen. Sie begleitete jeden Schritt mit großer Freundlichkeit und Geduld, und schaffte es, durch alle Höhen und Tiefen hindurch die Motivation aufrecht zu erhalten.

Besonderer Dank gilt den **Mitarbeitern des GI-Lab der Texas A&M University** für die großartige Unterstützung bei Planung und Durchführung der Studie, sowie für ihre außerordentliche Gastfreundschaft, die den Aufenthalt in College Station in jeder Hinsicht unvergesslich machte. Allen voran sei hier **Dr. Jan Suchodolski** erwähnt. Ohne sein großes Fachwissen, das er bereitwillig und geduldig mit uns geteilt hat, und seine ansteckende Begeisterung für die Mikrobiom-Forschung wäre die Umsetzung dieses Projekts nicht möglich gewesen. Maßgeblich zum Gelingen beigetragen haben hier auch **Prajesh Ravindran** und **Tariq Nisar**, deren Unterstützung bei der statistischen Datenauswertung unentbehrlich war.

Meiner „Doktor-Schwester“ **Elisabeth Dorn** möchte ich ganz herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit danken. Ohne sie wäre nicht nur die Publikationsliste viel kürzer, die ganze Sache hätte auch nur halb so viel Spaß gemacht! Danke, dass wir uns so gut ergänzt haben, ob bei der Jagd nach passenden Patienten, beim Kampf mit Laborgeräten und riesigen Datenmengen oder bei unseren Forschungs- und Kongressreisen!

Frau **Dr. Karin Weber** sei gedankt für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Den **Mitarbeitern der Medizinischen Kleintierklinik** vielen Dank für die Hilfe bei der oft mühsamen Probensammlung.

Meinen **Freunden und Kollegen** herzlichen Dank für die vielen Gespräche bei gemeinsamen Kaffeekränzchen, die zum Austausch, zur Motivation und Aufmunterung sehr hilfreich waren!

Großer Dank gebührt **meinen Eltern und meinen Schwestern**, die mich mit ihrer immerwährenden liebevollen Unterstützung durch Studium und Promotion begleitet und mir damit die Verwirklichung dieses Traums ermöglicht haben.

Zuletzt darf ein Dankeschön an alle **Hunde** nicht fehlen, die mir im Dienste der Wissenschaft bereitwillig Einblick in ihre Nasen gewährt haben.